

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
БІЛОЦЕРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ШИТА Оксана Петрівна

УДК 602.6:582.711.713:575.16

ДИСЕРТАЦІЯ

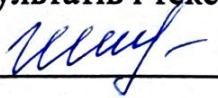
**ТРОФІЧНІ ТА ГОРМОНАЛЬНІ ДЕТЕРМІНАНТИ ОНТОГЕНЕЗУ
РЕГЕНЕРАНТІВ *PRUNUS DULCIS* (Mill.) D.A.Webb. *IN VITRO***

Спеціальність: 201 «Агрономія»

Галузь знань: 20 «Аграрні науки та продовольство»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

 Оксана ШИТА

Науковий керівник:

Вячеслав МАЦКЕВИЧ,
доктор сільськогосподарських наук,
доцент, професор кафедри загальної
екології та екотрофології

Біла Церква – 2025

АНОТАЦІЯ

Шита О. П. Трофічні та гормональні детермінанти онтогенезу регенерантів *Prunus dulcis* (Mill.) D.A.Webb. *in vitro*. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 201 – «Агрономія» (20 «Аграрні науки та продовольство»). – Білоцерківський національний аграрний університет, Біла Церква, 2025.

Кліматичні зміни належать до найактуальніших проблем сучасності, що загрожують агроекологічній та продовольчій безпеці, ускладнюючи досягнення сталого розвитку в рослинництві. Нерівномірний розподіл опадів, підвищення температури та антропогенні фактори спричиняють зміни природних зон і вимагають адаптації сільськогосподарських технологій.

У відповідь на сучасні виклики спостерігається зростання площ промислових насаджень горіхоплідних культур, зокрема, перспективним вважається мигдаль *Prunus dulcis* (Mill.) D.A.Webb. Попри щорічний імпорт майже 2,5 т, клімат України сприятливий для його вирощування, що відкриває можливості для диверсифікації агровиробництва.

Метою дослідження є визначення впливу трофічних і гормональних факторів на онтогенез регенерантів *Prunus dulcis* в умовах *in vitro*. Враховуючи низьку зимостійкість більшості іноземних сортів, було обрано чотири вітчизняні сорти мигдалю (Е5 Борозан, М41 Алекс, Джорджия, Луїза), зареєстровані у 2020 році.

Дослідження охоплює основні технологічні етапи мікроклонального розмноження (МКР): підготовку та стерилізацію експлантів, мультиплікацію *in vitro*, індукцію коренеутворення та адаптацію рослин *ex vitro*. Детально описано умови асептичного культивування, склад живильних середовищ та використання синтетичних фітогормонів для стимуляції росту.

Експерименти проведено в лабораторіях Білоцерківського національного аграрного університету та інших наукових установах, із зазначенням кратності дослідів, обсягів вибірок та повторюваності

результатів. Отримані дані є основою для подальшої оптимізації технологій розмноження мигдалю та його впровадження в промислове садівництво України.

У ході проведених досліджень визначено оптимальні умови для ефективної деконтамінації первинних експлантів мигдалю та стимуляції морфогенезу в умовах *in vitro*.

Максимальний рівень очищення експлантів від контамінантів (E_1) досягнуто при вирощуванні донорних рослин у депозитарних умовах, що забезпечило асептичність на рівні 81–91 %, що значно перевищувало показники для рослин, вирощених у відкритому ґрунті (59–70 %).

Серед досліджених стерилізуючих агентів найкращі результати продемонстрував Бланідас 300, який забезпечив високу ефективність деконтамінації (88–93 %) та сприяв утворенню максимальної кількості морфогенних експлантів (63–78 %).

Найбільшу ефективність стерилізації та морфогенезу показали бруньки, ізольовані навесні під час природного пробудження ($E_1 = 83–93$ %; $E_m = 47–70$ %). Водночас введення експлантів у культуру в період глибокого спокою суттєво знижувало рівень деконтамінації (3–9 %) та не сприяло морфогенезу.

Найвищий рівень асептичності (94–98 %) досягнуто у варіантах із використанням меристем та пагонів проростків. Однак через втрату генетичної стабільності, проростки не рекомендовано для подальших досліджень.

Оптимальним варіантом експлантів для прямого морфогенезу визначено бруньки, які характеризувалися високою ефективністю деконтамінації (86–94 %) та достатньою морфогенною активністю (47–69 %).

Дослідження впливу живильних середовищ показало, що середовище MS сприяє калусоутворенню, проте отримані калуси мали низьку морфогенну активність та піддавалися вітрифікації.

Оптимальним середовищем для індукції калусів виявилося NAM із додаванням БАП (1,0–5,0 мг/л) та ІМК (1,0–5,0 мг/л). Найкращі результати

отримано при комбінації БАП (1,0 мг/л) + кінетин (2,0 мг/л) + аденінсульфат (2,0 мг/л), що сприяло утворенню морфогенних калусів у 28–38 % експлантів.

Додавання гіберелової кислоти (ГК₃) у концентрації 1,0–2,0 мг/л значно підвищувало рівень морфогенезу в калусних культурах (73–94 %).

У ході проведеного дослідження вдалося розробити ефективну методику отримання асептичної культури мигдалю *in vitro* та оптимізувати процес непрямого морфогенезу. Отримані результати є цінними для подальшого вдосконалення методів мікроклонального розмноження цієї культури.

Походження експлантів відіграє ключову роль у процесі онтогенезу регенерантів. Для ефективного формування пагонів доцільно використовувати верхівки пагонів донорських рослин із вегетативними бруньками.

Аналіз впливу різних живильних середовищ на ефективність мультиплікації шляхом поділу конгломерату мікропагонів показав, що при меншій щільності мікропагонів спостерігалось збільшення їхньої довжини. Оптимальним середовищем для вишні та черешні визначено MS_{1/2}, тоді як для мигдалю найкращі результати продемонструвало середовище NAM із додаванням 1,0 мг/л бензиламінопурину та 0,1 мг/л індолілмасляної кислоти.

Дослідження впливу вуглеводів показало, що для вишні та черешні найкращим варіантом є сахароза в концентрації 30 г/л або комбінація 25 г/л сахарози з 5 г/л сорбіту. Для мигдалю оптимальним виявилось використання 25 г/л сахарози та 5 г/л сорбіту.

Додавання бензиламінопурину (0,25 мг/л) у поєднанні з кінетином (0,75 мг/л) сприяло збільшенню кількості мікропагонів завдяки дії БАПу, а також збільшенню розмірів пагонів (стебла і листків), водночас зменшуючи відсоток вітрифікованих рослин.

Для мінімізації негативних фітотоксичних наслідків, спричинених дисбалансом трофічних і гормональних факторів, рекомендовано періодично вводити рослинні об'єкти у стан спокою, що сприятиме їх гормональному перезавантаженню.

Встановлено, що біологічні особливості первинних експлантів, включно з ботанічним видом та сортом, впливають на накопичення фенолоподібних сполук, що можуть спричиняти токсичний ефект.

Серед досліджених середовищ для регенерантів мигдалю всіх чотирьох сортів найкращі результати продемонструвало середовище NAM_{мод.}

Використання молодих маточних рослин віком менше 90 днів як донорів експлантів виявилось недоцільним.

Періодичне введення донорських рослин у стан спокою є одним із важливих заходів для підтримки тривалого та стабільного пасажування мигдалю.

Стратегія мікроклонального розмноження мигдалю передбачає формування розетки пагонів із верхівкової бруньки шляхом індукції, оскільки лише вегетативні бруньки мають морфогенну активність. Через це поділ пагонів на одно- або двовузлові живці визнано технологічно недоцільним.

У ході дослідження впливу абіотичних та ендогенних факторів на ризогенез і постасептичну адаптацію регенерантів мигдалю *ex vitro* встановлено, що оптимізація умов культивування сприяє покращенню укорінення та підвищенню рівня виживаності рослин.

Одним із ключових факторів успішної адаптації є вибір субстрату. Найкращі результати продемонстрували перліт із підживленням (60,7 %) та кокосове волокно з підживленням (54,6 %). Найефективнішою виявилася їхня комбінація у співвідношенні 1:1, яка забезпечувала активний розвиток кореневої системи.

Освітлення відіграє важливу роль у ризогенезі та адаптаційних процесах. Оптимальними параметрами визнано світлову інтенсивність 4,4 KLux і 16-годинний фотоперіод, що забезпечувало 81,3 % приживлюваності та стимулювало ріст коренів.

Температурно-вологісний режим є критичним для успішного укорінення. Найсприятливішими умовами виявилися температура 24°C і вологість 85 %, що забезпечило 81,6 % приживлюваності рослин. Підвищення

температури до 30°C негативно позначалося на регенерантах через інтенсифікацію дихальних процесів і втрату органічних речовин.

Вплив ендогенних регуляторів росту також має суттєве значення. Найкращі результати отримано при використанні середовища, що містить 0,125 мг/л 6-бензиламінопурину (БАП) і 0,75 мг/л індолілмасляної кислоти (ІМК), що сприяло ефективному укоріненню.

Сортові особливості мають значний вплив на адаптаційний потенціал рослин. Найвищий рівень приживлюваності продемонстрував сорт Алекс (91,5 %), який також мав найдовші корені (136,4 мм). Високу ефективність показав сорт Е5 Борозан (89,7 %), тоді як Луїза відзначалася найбільшою кількістю коренів (8,3 шт.), що свідчить про її виражені компенсаторні механізми.

Отримані результати відіграють важливу роль у процесі вдосконалення технологій мікроклонального розмноження мигдалю та можуть бути застосовані для підвищення ефективності його адаптації *ex vitro*.

У результаті дослідження впливу абіотичних та ендогенних факторів на ризогенез і постасептичну адаптацію регенерантів мигдалю *ex vitro* встановлено, що оптимізація умов культивування сприяє підвищенню рівня укорінення та виживаності рослин.

Збалансоване поєднання зовнішніх факторів і ендогенних регуляторів дозволяє значно підвищити ефективність адаптації та подальшого культивування регенерантів *in vitro*.

Ключові слова: мигдаль, мікроклональне розмноження, *in vitro*, детермінанти, рослини-регенеранти, онтогенез, постасептична адаптація, *de novo*.

ANNOTATION

Shyta O. Trophic and hormonal determinants of ontogeny of *Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb regenerants *in vitro*. – Qualification scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in the specialty 201 – Agronomy (20 Agricultural Sciences and Food) – Bila Tserkva National Agrarian University, Bila Tserkva, 2025.

Climate change is one of the most pressing problems of our time, which threatens agro-ecological and food security, making it difficult to achieve sustainable development in crop production. Uneven distribution of precipitation, rising temperatures and anthropogenic factors cause changes in natural zones and require adaptation of agricultural technologies.

In response to modern challenges, there is an increase in the area of industrial plantations of nut crops, in particular, almonds *Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb are considered promising. Despite the annual import of almost 2,5 tons, the climate of Ukraine is favorable for its cultivation, which opens up opportunities for diversification of agricultural production.

The aim of the study is to determine the influence of trophic and hormonal factors on the ontogeny of *Prunus dulcis* regenerants *in vitro*. Taking into account the low winter hardiness of most foreign varieties, four domestic almond varieties (E5 Borozan, M41 Alex, Georgia, Louise) registered in 2020 were selected.

The study covers the main technological stages of microclonal propagation (MCP): explants preparation and sterilization, *in vitro* multiplication, root induction, and *ex vitro* plant adaptation. The conditions of aseptic cultivation, composition of culture media, and the use of synthetic phytohormones to stimulate growth are described in detail.

The experiments were conducted in the laboratories of the Bila Tserkva National Agrarian University and other scientific institutions, with an indication of the multiplicity of experiments, sample sizes, and repeatability of results. The data

obtained are the basis for further optimization of almond propagation technologies and its introduction into industrial horticulture in Ukraine.

In the course of the study, the optimal conditions for effective decontamination of primary almond explants and stimulation of morphogenesis *in vitro* were determined.

The maximum level of explants purification from contaminants (E_1) was achieved when growing donor plants in depository conditions, which ensured asepticity at the level of 81–91 %, which significantly exceeded the indicators for plants grown in open ground (59–70 %).

Among the studied sterilizing agents, the best results were demonstrated by Blanidas 300, which provided high decontamination efficiency (88–93 %) and contributed to the formation of the maximum number of morphogenic explants (63–78 %).

The highest efficiency of sterilization and morphogenesis was shown by buds isolated in spring during natural awakening ($E_1 = 83–93$ %; $E_m = 47–70$ %). At the same time, the introduction of explants into the culture during the period of deep dormancy significantly reduced the level of decontamination (3–9 %) and did not contribute to morphogenesis.

The highest level of asepticity (94–98 %) was achieved in variants using meristems and shoots of seedlings. However, due to the loss of genetic stability, seedlings are not recommended for further research.

The optimal variant of explants for direct morphogenesis was determined to be buds, which were characterized by high decontamination efficiency (86–94 %) and sufficient morphogenic activity (47–69 %).

The study of the effect of culture media showed that MS medium promotes callus formation, but the resulting calli had low morphogenic activity and were subject to vitrification.

NAM with the addition of BAP (1,0–5,0 mg/l) and IMC (1,0–5,0 mg/l) proved to be the optimal medium for callus induction. The best results were obtained with

the combination of BAP (1,0 mg/l) + kinetin (2,0 mg/l) + adenine sulfate (2,0 mg/l), which contributed to the formation of morphogenic calli in 28–38 % of explants.

The addition of gibberellic acid (GABA₃) at a concentration of 1,0–2,0 mg/l significantly increased the level of morphogenesis in callus cultures (73–94 %).

In the course of the study, it was possible to develop an effective method for obtaining an aseptic culture of almonds *in vitro* and optimize the process of indirect morphogenesis. The results obtained are valuable for further improvement of methods of microclonal propagation of this culture.

The origin of explants plays a key role in the ontogeny of regenerants. For efficient shoot formation, it is advisable to use the tops of donor plants with vegetative buds.

The analysis of the effect of different culture media on the efficiency of multiplication by dividing the conglomerate of micropropagules showed that at a lower density of micropropagules, an increase in their length was observed. The optimal medium for cherries and sweet cherries was MS_{1/2}, while for almonds the best results were demonstrated by NAM medium with the addition of 1,0 mg/l benzylaminopurine and 0,1 mg/l indoleic acid.

The study of the effect of carbohydrates showed that for cherries and sweet cherries the best option is sucrose at a concentration of 30 g/l or a combination of 25 g/l sucrose with 5 g/l sorbitol. For almonds, 25 g/l of sucrose and 5 g/l of sorbitol proved to be optimal.

The addition of benzylaminopurine (0,25 mg/l) in combination with kinetin (0,75 mg/l) increased the number of micropods due to the action of BAP, as well as the size of shoots (stem and leaves), while reducing the percentage of vitrified plants.

To minimize the negative phytotoxic effects caused by an imbalance of trophic and hormonal factors, it is recommended to periodically introduce plant objects into a state of rest, which will facilitate their hormonal reloading.

It was found that the biological characteristics of primary explants, including botanical species and variety, affect the accumulation of phenol-like compounds that can cause toxic effects.

Among the studied media for almond regenerants of all four varieties, the best results were demonstrated by the NAMmod medium.

The use of young mother plants less than 90 days old as explant donors was not advisable.

Periodic introduction of donor plants into dormancy is one of the important measures to maintain long-term and stable almond passage.

The strategy of microclonal propagation of almonds involves the formation of a rosette of shoots from the apical bud by induction, since only vegetative buds have morphogenic activity. Because of this, the division of shoots into one- or two-node cuttings was recognized as technologically impractical.

The study of the influence of abiotic and endogenous factors on the rhizogenesis and post-accident adaptation of almond regenerants *ex vitro* revealed that optimization of cultivation conditions improves rooting and increases plant survival.

One of the key factors for successful adaptation is the choice of substrate. The best results were demonstrated by perlite with fertilization (60,7%) and coconut fiber with fertilization (54,6%). The most effective was their combination in a 1:1 ratio, which ensured active development of the root system.

Lighting plays an important role in rhizogenesis and adaptation processes. The optimum parameters were found to be a light intensity of 4,4 KLux and a 16-hour photoperiod, which provided 81,3 % survival rate and stimulated root growth.

Temperature and humidity conditions are critical for successful rooting. The most favorable conditions were 24°C and 85% humidity, which ensured 81,6% plant survival. An increase in temperature to 30 °C had a negative effect on the regenerants due to intensification of respiratory processes and loss of organic matter.

The influence of endogenous growth regulators is also significant. The best results were obtained when using a medium containing 0,125 mg/l of 6- benzylaminopurine (BAP) and 0,75 mg/l of indoleic acid (IA), which contributed to effective rooting.

Varietal characteristics have a significant impact on the adaptive potential of plants. The highest survival rate was demonstrated by M 41 Aleks (91,5%), which also had the longest roots (136,4 mm). The E 5 Borožan variety showed high efficiency (89,7%), while Luiza was characterized by the largest number of roots (8,3), indicating its pronounced compensatory mechanisms.

The obtained results play an important role in the process of improvement of almond microclonal propagation technologies and can be used to increase the efficiency of its *ex vitro* adaptation.

The study of the influence of abiotic and endogenous factors on the rhizogenesis and post-acidic adaptation of almond regenerants *ex vitro* revealed that optimization of cultivation conditions contributes to an increase in the level of rooting and plant survival.

A balanced combination of external factors and endogenous regulators can significantly increase the efficiency of adaptation and further cultivation of regenerants *in vitro*.

Key words: almond, microclonal propagation, *in vitro*, determinants, regenerated plants, ontogeny, post-apoptotic adaptation, *de novo*.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті в наукових виданнях, включених до переліку

фахових видань України:

1. Мацкевич В.В., Кімейчук І.В., Мацкевич О.В., **Шита О.П.** Світовий досвід, перспективи в Україні розмноження фундука та мигдалю. *Агробіологія*. 2022. № 1. С. 179–191. DOI: 10.33245/2310-9270-2022-171-1-179-191 (планування і виконання досліджень, аналіз даних, написання статті, частка участі – 25 %).

2. Шита О.П. Детермінанти розмноження *Prunus dulcis* (mill.) D.A.Webb. біотехнологічними методами *Агробіологія*. 2022. № 2. С. 137–152. DOI: 10.33245/2310-9270-2022-174-2-137-152.

3. Шита О.П. Розробка протоколу отримання асептичної культури *Prunus dulcis* (Mill.) D.A.Webb. *Агробіологія*. 2023. № 1. С. 157–168. DOI: 10.33245/2310-9270-2023-179-1-157-168.

4. **Шита О.П.**, Філіпова Л.М., Мацкевич В.В. Особливості мультиплікації *in vitro* кісточкових культур. *Агробіологія*. 2024. № 1. С. 222–236. DOI: 10.33245/2310-9270-2024-187-1-222-236 (планування і виконання досліджень, аналіз даних, написання статті, частка участі – 30 %).

Статті у періодичних наукових виданнях, проіндексованих у базах даних

Web of Science Core Collection та/або Scopus:

1. Matskevych V., Yukhnovskyi V., Kimeichuk I., Matskevych O., **Shyta O.** Peculiarities of determining the morphogenesis of plants *Corylus avellana* L. and *Prunus dulcis* (Mill.) D.A.Webb *in vitro* culture. *Folia Forestalia Polonica*. 2023. Vol. 65, No. 1. P. 1–14. DOI: 10.2478/ffp-2023-0001 (планування і виконання досліджень, аналіз даних, написання статті, частка участі – 30 %).

Матеріали науково-практичних конференцій:

1. **Шита О.П.**, Філіпова Л.М., Мацкевич В.В. Детермінанти онтогенезу *Prunus dulcis in vitro*. *Актуальні проблеми, шляхи та перспективи розвитку ландшафтної архітектури, садово-паркового господарства, урбоекології та*

фітомеліорації: матеріали міжнародної науково-практичної конференції (Біла Церква, 16–17 вересня 2021 р.). Біла Церква : БНАУ, 2021. С. 68–70.

2. Філіпова Л.М., Мацкевич В.В., **Шита О.П.** Трофічні детермінанти онтогенезу регенерантів мигдалю *in vitro*. *Генетика і селекція в сучасному агрокомплексі: матеріали VI всеукраїнської науково-практичної конференції*. Редкол.: О.О. Непочатенко (відп. ред.) та ін. (Умань, 15 жовтня 2021). Умань : УНУС, 2021. С. 202–204.

3. **Шита О.П.**, Кімейчук І.В., Мацкевич В.В. Детермінанти росту й розвитку мигдалю *in vitro*. *Сучасний стан та перспективи розвитку науки, освіти та суспільства: збірник тез доповідей міжнародної науково-практичної конференції*. Полтава : ЦФЕНД, 15 серпня 2022. С. 40–42.

4. **Шита О.П.** Вплив фітогормональних та трофічних детермінантів на культивування мигдалю в умовах *in vitro*. *Актуальні проблеми, шляхи та перспективи розвитку ландшафтної архітектури, садово-паркового господарства, урбоєкології та фітомеліорації: матеріали II Міжнародної науково-практичної конференції* (Біла Церква, 29 вересня 2022 р.). Біла Церква : БНАУ, 2022. С. 126–129.

5. **Шита О.П.** Детермінація онтогенезу первинних експлантів *Prunus dulcis* (Mill.) D.A.Webb за непрямого морфогенезу. *Аграрна освіта і наука : досягнення та перспективи розвитку: матеріали IV Міжнародної науково-практичної конференції* (Біла Церква, 30 березня 2023 р.). Біла Церква : БНАУ, 2023. С. 46–51.

6. **Шита О.П.**, Мацкевич В.В. Деконтамінація первинних експлантів *Prunus dulcis* (Mill.) D.A.Webb. Сучасний стан, проблеми і перспективи лісівничої освіти, науки та виробництва: матеріали III Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції (Біла Церква, 14 квітня 2023 р.). Біла Церква: БНАУ, 2023. С. 74–77.

7. **Шита О.П.**, Мацкевич В.В., Філіпова Л.М. Вплив живильного середовища на отруєння продуктами окислення фенолподібних речовин. *XVIII*

International Scientific and Practical Conference «Theories of world science and technology implementation» (May 08-10, Osaka, Japan, 2023). С. 10–12.

8. **Шита О.**, Філіпова Л., Мацкевич В. Удосконалений протокол мікроклонального розмноження *Prunus Dulcis* (Mill.) D.A.Webb Collection of Scientific Papers «ΛΟΓΟΣ» (May 26, 2023; Boston, USA). С. 127–130.

9. **Шита О.П.**, Філіпова Л.М., Мацкевич В.В. Особливості загальної стратегії живцювання мигдалю *in vitro*. Матеріали IV Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції (Біла Церква, 19 квітня 2024 р.). Біла Церква: БНАУ, 2024. С. 122–124.

10. **Shyta O.**, Filipova L., Matskevych V. Influence of endogenous determinants on the adaptation of almond plants *in vitro*. *Ресурсозберігаючі технології вирощування культурних рослин : матеріали I Міжнародної науково-практичної конференції*. (Біла Церква, 20 березня 2025 р.). Біла Церква : БНАУ, 2025. С. 39–42.

11. **Shyta O.**, Filipova L., Matskevych V. Influence of light on the determination of rhizogenesis of almond plants *in vitro*. *Аграрна освіта і наука: досягнення та перспективи розвитку : матеріали VI Міжнародної науково-практичної конференції* (Біла Церква, 27 березня 2025 р.). Біла Церква: БНАУ, 2025. С. 100–103.

12. Filipova L., **Shyta O.**, Matskevych V. B.B. Effect of medium acidity on rhizogenesis of sweet almond (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A.Webb) *in vitro*. *Сучасні виклики і актуальні проблеми лісівничої освіти, науки та виробництва: матеріали V Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції* (Біла Церква, 18 квітня 2025 р.). Біла Церква: БНАУ, 2025. С. 95–97.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	17
ВСТУП	18
РОЗДІЛ 1. ДЕТЕРМІНАНТИ РОЗМНОЖЕННЯ МИГДАЛЮ БІОТЕХНОЛОГІЧНИМИ МЕТОДАМИ (огляд літератури)	24
1.1. Перспективність виробництва садивного матеріалу мигдалю	24
1.2. Основні етапи мікроклонального розмноження	25
1.3. Калусна культура як шлях розмноження непрямим морфогенезом	27
1.4. Детермінанти онтогенезу <i>in vitro</i>	29
1.5. Гормональна детермінація	39
1.6. Переформатування детермінант	42
Висновки до розділу 1	43
РОЗДІЛ 2. УМОВИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ	44
2.1. Етапи проведення досліджень	44
2.2. Кратність дослідів та об'єми вибірок	45
2.3. Місце проведення досліджень та вихідний матеріал	46
2.4. Особливості умов асептичного культивування	47
2.5. Підготовка донорів експлантів та деконтамінація первинних експлантів	48
2.6. Базові середовища	49
2.7. Характеристика синтетичних гормонів	50
2.8. Особливості мультиплікації та індукції ризогенезу <i>in vitro</i>	51
Висновки до розділу 2	54
РОЗДІЛ 3. ДЕКОНТАМІНАЦІЯ ТА ДЕТЕРМІНАЦІЯ ОНТОГЕНЕЗУ ПЕРВИННИХ ЕКСПЛАНТІВ	55
3.1. Вплив підготовки материнських рослин на виділення фенолоподібного ексудату первинними експлантами	55
3.2. Ефективність деконтамінації	58
3.3. Дедиференціація та диференціація первинних експлантів	65
Висновки до розділу 3	71
РОЗДІЛ 4. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ РОЗМНОЖЕННЯ ТА ОНТОГЕНЕЗУ МИГДАЛЮ (<i>PRUNUS DULCIS</i>) ТА ІНШИХ КІСТОЧКОВИХ КУЛЬТУР <i>IN VITRO</i>	73
4.1. Особливості загальної стратегії живцювання мигдалю <i>in vitro</i>	73
4.2. Особливості трофічної, фітогормональної детермінації <i>Prunus Dulcis</i> онтогенезу <i>in vitro</i>	75

4.3	Особливості мультиплікації <i>in vitro</i> кісточкових культур	88
	Висновки до розділу 4	106
	РОЗДІЛ 5. ДЕТЕРМІНАЦІЯ РИЗОГЕНЕЗУ	108
5.1	Фітогормональні детермінанти коренеутворення	108
5.2	Ендогенні детермінанти донорів експлантів	113
5.3	Вікові особливості експлантів	118
5.4	Трофічні детермінанти	120
5.5	Корбонумісні компоненти середовища	123
5.6	Світло	126
5.7	Фотоперіод	128
	Висновки до розділу 5	129
	РОЗДІЛ 6. ПОСТАСЕПТИЧНА АДАПТАЦІЯ	131
6.1	Коренеутворення регенерантів	131
6.2	Вплив світла на ризогенез під час постасептичної адаптації	135
6.3	Вплив вологості повітря та температури повітря на успішність адаптації рослин <i>in vitro</i>	137
6.4	Ендогенні детермінанти	139
	Висновки до розділу 6	142
	ВИСНОВКИ	143
	РЕКОМЕНДАЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ (Протокол технології міроклонального розмноження)	146
	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	151
	ДОДАТКИ	172

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

БАП – бензиламінопурин

ГК – гіберелова кислота, гіберелін

ІМК – індолілмасляна кислота

ІОК – індолілоцтова кислота

МКР – МКР рослин, в умовах *in vitro* з міксогетеротрофним живленням

НОК - нафтилоцтова кислота

PPM – Plant Preservative Mixture застосовувався як основний деконтамінант

ФАМКР – фотоавтотрофний метод МКР

de novo – процес формування коренів, ризогенез

DKW – живильне середовище за прописом Драйвером і Куніюкі

ex vitro – перше постасептичне вирощування рослин *in vitro*

in vivo – вирощування матеріалу у природних умовах

MS (MC) – живильне середовище за прописом Мурасіге і Скуга

MS1/2 – живильне середовище за прописом Мурасіге і Скуга із половинним набором

NAM – живильне середовище Nas Almond Medium

NRM – живильне середовище Nas Red Medium

QL – живильне середовище за прописом Куаріна і Лепувра

WPM (Woody Plant Medium) – живильне середовище за прописом Ллойда і Маккауна

ВСТУП

Актуальність теми. В Україні, як і в багатьох інших країнах, однією з найактуальніших проблем є зміна клімату. Вона створює загрози продовольчій та агроекологічній безпеці людства, ускладнюючи досягнення цілей сталого розвитку в рослинництві.

Зміна клімату є наслідком впливу комплексу природних і антропогенних факторів. Основною її причиною виступає людська діяльність – зокрема, неефективні методи землеробства, вирубування лісів, забруднення водних ресурсів тощо.

Нерівномірний розподіл опадів і підвищення температури повітря створюють сприятливі умови для поширення нетипових видів флори та фауни. Це може призвести до значних змін у природних та кліматичних зонах як у світі, так і в Україні.

Зміни кліматичних умов сприяють розвитку нових напрямів землеробства, впровадженню інноваційних органічних біотехнологій та розширенню асортименту вирощуваних плодових культур.

В Україні спостерігається тенденція до зростання промислового вирощування плодових деревних культур, зокрема горіхоплідних. До цієї групи належать рослини, характерні для помірного та субтропічного клімату, які об'єднують представників різних родин із твердими плодами – горіхами та сухими кістянками. Серед них – фундук, фісташка, каштан їстівний, горіх волоський, мигдаль, а також менш поширені види, такі як кедр сибірський й бук. Головною цінністю цих плодів є насіння, відоме як ядро.

Серед зазначених культур особливе місце посідає мигдаль – цінна горіхоплідна культура, яка вирощується у багатьох країнах світу з метою отримання високоякісних мигдальних ядер. Актуальність вирощування цієї культури в Україні зростає у зв'язку з кліматичними змінами: сухе, жарке та маловодне літо створює сприятливі передумови для розширення площ під

насадженнями мигдалю, відкриваючи нові можливості для диверсифікації традиційного сільського господарства.

Водночас потреба в наросуванні власного виробництва мигдалю є надзвичайно актуальною, оскільки наразі Україна щороку імпортує близько 2,5 тис. тонн мигдальних горіхів.

У зв'язку з глобальним потеплінням та змінами клімату надзвичайно актуальним є налагодження промислового розсадництва мигдалю в Україні. Створення мигдальних садів — один із дієвих шляхів диверсифікації сільськогосподарського виробництва в умовах мінливого клімату. Водночас в Україні наразі відсутні технології масового високоякісного виробництва садивного матеріалу мигдалю, що й обумовлює актуальність проведених досліджень.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Тематика дослідження є частиною наукової роботи Білоцерківського національного аграрного університету, що здійснюється на кафедрі загальної екології та екотрофології в рамках визначеної тематики «Антропогенна трансформація екосистем ландшафтної сфери Правобережного Лісостепу України та методологічні засади збалансованого використання їхніх ресурсів» (номер державної реєстрації 0119U100467) на період 2024–2025 років.

Мета і завдання дослідження. Метою дослідження було вивчення фізіолого-біохімічних та анатомо-морфологічних особливостей, що проявляються в процесі культивування *in vitro*, розроблення теоретико-експериментального обґрунтування оптимізації технологічного процесу вирощування рослин виду *Prunus dulcis* в умовах *in vitro* та *ex vitro* шляхом удосконалення методів деконтамінації первинних експлантів, мультиплікації пагонів, ризогенезу та постасептичної адаптації рослин до умов зовнішнього середовища.

Для досягнення поставленої мети дослідження передбачається вирішити такі завдання:

- розробити та експериментально обґрунтувати ефективні методи деконтамінації первинних експлантів із урахуванням їхніх вікових, анатомічних, видових особливостей та ступеня мікробного контамінування; визначити оптимальні принципи первинного культивування й адаптації біологічних об'єктів до умов *in vitro*;

- визначити вплив походження, віку та сортових особливостей донорських рослин на онтогенетичний потенціал і морфогенез експлантів в умовах *in vitro*;

- оптимізувати склад живильних середовищ для стимулювання стабільної та тривалої мультиплікації рослин у культурі *in vitro* та регулювання трофічної детермінації онтогенезу;

- теоретично обґрунтувати та експериментально перевірити ефективні підходи до регуляції гормональної детермінації ризогенезу та розвитку вегетативної морфоструктури регенерантів мигдалю;

- дослідити вплив абіотичних факторів (інтенсивність й спектр світла, фотоперіод, температура, вологість) на ефективність ризогенезу та постасептичної адаптації регенерантів *in vitro*;

- удосконалити існуючі та розробити нові методики постасептичної адаптації рослин-регенерантів до умов зовнішнього середовища з урахуванням оптимального поєднання абіотичних і ендогенних регуляторів.

Об'єкт дослідження – методи мікроклонального розмноження та адаптації рослин *Prunus dulcis* в умовах *in vivo*.

Предмет дослідження – трофічні та гормональні детермінанти мікроклонального розмноження *Prunus dulcis in vivo*.

Методи досліджень. У процесі дослідження було використано як загальнонаукові, так і спеціальні методи. До загальнонаукових методів належать: *формулювання гіпотези, експеримент та спостереження*. Серед спеціальних методів у роботі застосовували *біотехнологічні, біохімічні, лабораторні та підходи*.

Наукова новизна отриманих результатів полягає у теоретичному обґрунтуванні та експериментальному аналізі впливу ендогенних й екзогенних детермінант на онтогенез регенерантів *Prunus dulcis* (Mill.) D.A.Webb в умовах *in vitro* та під час постасептичної адаптації *ex vitro*, у розробці та удосконаленні технологічного протоколу мікроклонального розмноження нових вітчизняних сортів мигдалю солодкого.

Уперше: створено технологію підготовки донорських рослин мигдалю для отримання первинних експлантів у депозитарних умовах; проаналізовано особливості культивування первинних експлантів залежно від сортових характеристик; розроблено методичні засади деконтамінації первинних експлантів із використанням препарату «Бланідас 300»; виявлено гормональну детермінацію на всіх етапах мікроклонального розмноження мигдалю; обґрунтовано ефективність диференційованого застосування модифікованих живильних середовищ на різних стадіях морфогенезу; виявлено різну детермінаційну активність синтетичних аналогів фітогормонів за умов варіативної інтенсивності освітлення.

Удосконалено протокол мікроклонального розмноження нових вітчизняних сортів мигдалю, що забезпечує підвищення ефективності мультиплікації, ризогенезу та постасептичної адаптації регенерантів.

Набули подальшого розвитку наукові положення щодо: синергізму та антагонізму гормональних й трофічних детермінант у процесах регенерації рослин з первинних експлантів; впливу морфофізіологічної неоднорідності експлантів, ізольованих з різних частин пагона, на онтогенез регенерантів; ролі комплексу ендогенних чинників у регуляції морфогенезу рослин за різних умов культивування донорських рослин первинних експлантів.

Практичне значення отриманих результатів. На основі отриманих результатів розроблено науково обґрунтовані рекомендації з удосконалення елементів технологічного протоколу мікроклонального розмноження нових вітчизняних сортів мигдалю.

Отримані результати апробовано та впроваджено у виробництво в розсаднику Національного дендрологічного парку «Софіївка» НДІ НАН України (*Додаток Б*), та міжкафедральній лабораторії біотехнології рослин Білоцерківського національного аграрного університету МОН України. Крім того, результати дослідження інтегровано в освітній процес університету та включено до навчальних програм дисциплін «Основи біотехнології рослин» і «Біотехнологія та генетична інженерія» (*Додаток А*).

Особистий внесок здобувача включає самостійний огляд й аналіз наукової літератури, визначення напрямку дослідження, обґрунтування його концепції, формулювання робочих гіпотез, розроблення програми та плану експерименту, організацію та проведення експериментальних досліджень, оброблення й узагальнення отриманих результатів, формулювання висновків та розроблення практичних рекомендацій щодо їх впровадження у виробничу діяльність.

Здобувачкою особисто виконано експериментальну роботу, проведено лабораторні спостереження, обліки та аналізи, здійснено узагальнення результатів, сформульовано висновки та підготовлено практичні рекомендації, які викладено у наукових статтях й матеріалах науково-практичних конференцій, що відображають ключовий зміст дисертації.

Апробація результатів дисертації. Результати проведених досліджень було представлено на засіданнях кафедри лісівництва та агробіотехнологічного факультету Білоцерківського національного аграрного університету МОН України (упродовж 2021–2025 рр.), а також на наукових конференціях: Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні проблеми, шляхи та перспективи розвитку ландшафтної архітектури, садово-паркового господарства, урбоекоекології та фітомеліорації» (Біла Церква, 16–17 вересня 2021 р.); VI Всеукраїнській науково-практичній конференції «Генетика і селекція в сучасному агрокомплексі» (Умань, 15 жовтня 2021 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасний стан та перспективи розвитку науки, освіти та суспільства» (Полтава, 15 серпня 2022 р.);

II Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні проблеми, шляхи та перспективи розвитку ландшафтної архітектури, садово-паркового господарства, урбоекології та фітомеліорації» (Біла Церква, 29 вересня 2022 р.); IV Міжнародній науково-практичній конференції «Аграрна освіта і наука: досягнення та перспективи розвитку» (Біла Церква, 30 березня 2023 р.); III Міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Сучасний стан, проблеми і перспективи лісівничої освіти, науки та виробництва» (Біла Церква, 14 квітня 2023 р.); XVIII Міжнародній науково-практичній конференції «*Theories of world science and technology implementation*». (May 08-10, Osaka, Japan, 2023); IV Міжнародній науково-практичній конференції «Collection of Scientific Papers “ΛΟΓΟΣ”» (May 26, 2023; Boston, USA); IV Міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Сучасний стан, проблеми і перспективи лісівничої освіти, науки та виробництва» (Біла Церква, 19 квітня 2024 р.); I Міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Ресурсозберігаючі технології вирощування культурних рослин» (Біла Церква, 20 березня 2025 р.); VI Міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Аграрна освіта і наука: досягнення та перспективи розвитку» (Біла Церква, 27 березня 2025 р.); V Міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Сучасні виклики і актуальні проблеми лісівничої освіти, науки та виробництва» (Біла Церква, 18 квітня 2025 р.).

Публікація матеріалів дослідження. Основні результати дисертації висвітлено у 17 наукових публікаціях, зокрема: 4 статті у наукових фахових виданнях України; 1 стаття в журналі, індексованому в міжнародній наукометричній базі Scopus; 12 тез доповідей в збірниках матеріалів науково-практичних конференцій.

Обсяг і структура дисертації. Дисертація викладена на 177 сторінках комп'ютерного набору, містить 37 таблиць, 26 рисунків. Робота складається зі вступу, 6 розділів, висновків, рекомендацій та 3 додатків. Список використаних джерел налічує 171 найменувань, з яких 94 латиницею.

РОЗДІЛ 1

ДЕТЕРМІНАНТИ РОЗМНОЖЕННЯ МИГДАЛЮ БІОТЕХНОЛОГІЧНИМИ МЕТОДАМИ

(огляд літератури)

1.1. Перспективність виробництва садивного матеріалу мигдалю

Мигдаль є перспективною промисловою горіхоплідною культурою, яка сприяє зниженню кліматичних ризиків і підвищенню рентабельності агровиробництва, особливо в південних областях України [1, 2, 14, 78, 171].

Ця цінна культура вирощується в багатьох країнах світу для отримання мигдальних ядер. В Україні щорічний обсяг імпорту мигдалю становить приблизно 2,5 тис. тонн [15, 37, 156]. Однак сорти іноземної селекції характеризуються низькою зимостійкістю [24] та тривалим вегетаційним періодом. Одночасно було розроблено та протестовано українські сорти мигдалю, які потребують прискореного розмноження.

Зокрема, до Державного реєстру сортів рослин, дозволених для вирощування в Україні, внесено чотири високопродуктивні вітчизняні сорти, селекціоновані В.М. Бабанським у ФГ ім. Унанова [41]. До 2020 року в цьому розділі реєстру не було жодного українського сорту мигдалю [38].

Для збереження генетичної стабільності сортовий мигдаль розмножують вегетативними методами, такими як відсадки, щеплення та поросль [24, 110]. Найбільш розповсюдженим методом є щеплення на гіркий мигдаль [156]. Для отримання повноцінного саджанця необхідно 1–2 роки для вирощування підщепи, а потім стільки ж часу на розвиток прищепи.

При вирощуванні мигдалю у відкритому ґрунті він зазнає впливу різних збудників хвороб, зокрема грибкових, вірусних і бактеріальних, спричинених мікроорганізмами [23, 36, 95]. У зв'язку з цим сучасні розсадники активно переходять на біотехнологічні методи вирощування садивного матеріалу [1, 8, 13, 18, 19, 22, 25, 30, 32, 34, 40, 44, 94, 98] (табл. 1.1).

Таблиця 1.1

Біолого-господарська оцінка сортів мигдалю, залучених в дослідженнях*

Показник	М 41Алекс	Е5 Борозан	Джорджия	Луїза
Напрямок використання	Універсального призначення			
Група стиглості	середньо стиглий	середньо стиглий	середньо стиглий	середньо стиглий
Сила росту	7-сильна	7-сильна	7-сильна	5-середня
Урожайність	2,55 т/га	2,75 т/га	2,5 т/га	2,3 т/га
Стійкість до посухи	8	8	8	8
Зимостійкість, бал (1–9)	9	9	8	7
Ступінь самоплідності, %	48,0	48,0	50,5	53,0
Середня маса плоду, г	4,5	6,5	4,1	3,8
Вміст у плодах: білка, %	23,5	20,5	35,0	32,5
жирної олії, %	56,7	58,7	58,0	56,8
Дегустаційна оцінка, бал (1–9)	8	8	9	8

Примітка: сформовано на основі даних джерела [41].

Розмноження мигдалю методом *in vitro* має низку переваг [24, 73, 168]:

- уже з другого року після впровадження технології забезпечується високий темп розмноження;
- ізолювані умови мінімізують ризик повторного інфікування рослин;
- виключається можливість засмічення насаджень гірким мигдалем;
- відсутні проблеми в місці з'єднання «підщепа–прищепа».

Дослідження на рівні ДНК показали, що у регенерантів мигдалю після шести років культивування *in vitro* за умови дотримання технології вирощування соматоклональних варіацій не виникало, що підтверджує збереження генетичної константності [129, 151].

1.2. Основні етапи мікроклонального розмноження

Мікроклональне розмноження (МКР) може здійснюватися двома шляхами: прямим морфогенезом, що відбувається через наявні бруньки, та непрямим морфогенезом, який проходить через калусні культури, клітинні суспензії, ембріони або штучне насіння. Найбільш розповсюдженим

технологічним методом є мікроклональне розмноження шляхом прямого морфогенезу [13, 103, 106, 107, 111, 122, 150].

Більшість науковців виділяють чотири основні етапи цього процесу:

- I впровадження первинних експлантів в асептичні умови та їх подальше культивування;
- II розмноження шляхом живцювання (мультиплікація);
- III стимулювання коренеутворення;
- IV адаптація рослин *in vitro* до умов відкритого середовища.

Деякі дослідники [50] додають ще один «нульовий» етап, який включає підготовку маточних рослин-донорів експлантів. Їх вирощують у закритому ґрунті за контрольованих умов освітлення, ізоляції від патогенів та застосування пестицидів для запобігання контамінації. Крім того, обрізання пагонів сприяє пробудженню бруньок [19, 22, 44, 124].

На початковому етапі живильні середовища зазнають змін. Первинні експланти зазвичай спершу висаджують у середовища зі зниженим удвічі вмістом поживних речовин і підвищеним рівнем цитокінінів та гіберелінів [48]. Оскільки гормони накопичуються в тканинах «про запас», а метаболічні процеси зазнають перебудови, склад середовищ коригують відповідно до цих змін [63, 84, 90].

Для запобігання самоінтоксикації, викликаній продуктами окиснення фенольних сполук, до середовища додають антиоксиданти. Також вживають заходів, що зменшують синтез фенолоподібних сполук у донорських рослинах, зокрема, застосовують розсіяне освітлення та обмежують азотне живлення материнських рослин [78, 87, 84, 89].

Другий етап мікроклонального розмноження спрямований на максимальне збільшення вихідного матеріалу з найвищим можливим коефіцієнтом розмноження без втрати здатності до проліферації та регенерації. Цей коефіцієнт визначається кількістю експлантів, отриманих із одного донора, тривалістю їхнього росту та відсотком браку [121, 155]. Для

збільшення кількості експлантів стимулюють активність бруньок, зазвичай усуваючи апікальне домінування шляхом застосування цитокинінів [6, 16, 17, 89, 113, 118, 154].

На третьому етапі проводять пересаджування рослин-регенерантів на середовище, що сприяє коренеутворенню [10], або здійснюють живцювання маточних рослин із подальшим висаджуванням експлантів у середовище з підвищеним рівнем ауксинів.

Внесення гормонів із груп цитокинінів та ауксинів на другому і третьому етапах відбувається згідно з правилом Скуга-Міллера [128, 131, 132, 133]. Під час мультиплікації в живильному середовищі переважають цитокиніни, тоді як для активізації коренеутворення їхню концентрацію зменшують, одночасно коригуючи рівень ауксинів [11, 44, 63, 148, 170].

Четвертий етап, відомий як постасептична адаптація, акліматизація або реадаптація [28, 96, 141, 142], передбачає морфолого-анатомічні зміни, необхідні для успішного переходу рослин *ex vitro* та їх подальшого виживання.

1.3. Калусна культура як метод розмноження через непрямий морфогенез

При використанні методу непрямого морфогенезу спочатку формують калусні культури, з яких згодом індукують розвиток бруньок або ембріоїдів [7, 29, 99, 100, 164]. Успішне культивування калусних культур мигдалю відоме вже понад 50 років.

Зокрема, А Mehra із колегами [123] досягли дедиференціації та стабільного розвитку калусної культури, застосовуючи базальне середовище Мурасіге й Скуга з додаванням допоміжних речовин. Для дедиференціації використовували майже всі частини рослини мигдалю, зокрема верхівку пагона, стебло, листя, корінь, гіпокотиль і сім'ядолі [145].

Для стимуляції дедиференціаційного процесу в живильне середовище додавали:

- нафтилоцтову кислоту (5 ppm) разом із кокосовою водою (10%);

- або нафтилоцтову кислоту (5 ppm) у поєднанні з 1 г/л гідролізату казеїну (суміш амінокислот за [43]);
- кінетин або інші цитокініни.

У складі калусних клітин спостерігалася різна плоїдність, серед якої переважали диплоїди, а також траплялися триплоїди, тетраплоїди та анеуплоїди.

P.J. Ainsley та його співавтори [80] розробили методику стимуляції морфогенезу калусних тканин *Prunus dulcis* Mill, отриманих із листкових експлантів рослин, вирощених *in vitro*. Культивування здійснювали на середовищі відповідно до протоколу Almehdi і Parfitt [61, 68, 135, 137], використовуючи різні комбінації одного з трьох ауксинів (2,4-дихлорфеноксіоцтової кислоти, α -нафталінооцтової кислоти або індол-3-масляної кислоти) разом із двома цитокінінами (бензиламінопурином і тидіазуроном), а також різними концентраціями гідролізату казеїну.

Дослідження показали, що реакція сортів на ауксини є різною: для сорту *Ne Plus Ultra* ефективними виявилися нафталоцтова кислота та індолілмасляна кислота, тоді як у сорту *Nonpareil* позитивний результат спостерігався лише при застосуванні індолілмасляної кислоти [91, 130].

Щодо цитокінінів, у *Ne Plus Ultra* пагоноутворення відбувалося як за присутності бензиламінопурину (БАП), так і тидіазурону, тоді як для *Nonpareil* ефективним виявився виключно тидіазурон.

Додавання 0,1 % гідролізату казеїну покращувало морфологічні властивості калусу та підвищувало частоту регенерації у представників обох сортів.

Крім того, M. Antonelli вдалося отримати ембріони з калусної тканини мигдалю [83, 168]. Такий підхід має перспективи не лише в селекційних програмах, а й у розробленні технологій створення штучного насіння [114, 145].

1.4. Детермінанти онтогенезу *in vitro*

Онтогенез рослин *in vitro* – це складний процес, що визначається багатьма факторами, які впливають на ріст, розвиток і морфогенез тканин [99]. Основним механізмом регуляції онтогенезу є реалізація генетичної програми (спадкової інформації), яка міститься в кожній клітині організму та активується на різних стадіях його розвитку. Ця програма реалізується вибірково, забезпечуючи розвиток ознак і властивостей, для яких створені сприятливі умови.

На розвиток рослинного об'єкта та визначення його онтогенетичного шляху впливають групи детермінуючих факторів: гормональні, трофічні та фізичні. В умовах *in vitro* ці фактори можуть мати як ендогенне походження, зокрема передане від донора експлантів, так і екзогенне, забезпечене зовнішніми умовами середовища.

Детермінанти поділяються на три основні групи: гормональні, трофічні та фізичні, а за їх походженням виділяють ендогенні та екзогенні.

Детермінація та вибіркова експресія генів. Біотехнологічні процеси, зокрема мікроклональне розмноження, працюють із біологічними об'єктами, що знаходяться на різних рівнях саморозвитку, самоорганізації та саморегуляції [5, 30, 93, 110, 111]. Ключовим механізмом регуляції онтогенезу як у природних умовах, так і в специфічних біотехнологічних середовищах *in vitro* є вибіркова експресія генетичної інформації [117, 121, 162].

Кожен етап онтогенезу контролюється активацією окремих генів або їхніх груп [53]. Генетична програма реалізується поступово, зокрема активуються лише ті напрямки розвитку, для яких створені оптимальні умови [103, 105]. У середовищі *in vitro* детермінація експресії генів визначає основні процеси цитогенезу, органогенезу та морфогенезу [56].

Таким чином, керуючи умовами культивування первинного експланта, можна спрямовувати його розвиток у різні напрями, зокрема стимулювати утворення калусу та його похідних (клітинної суспензії, ембріоїдів, штучного

насіння), формування конгломерату пагонів або ж отримання укоріненого регенеранта [114, 147].

У технологічному аспекті формується система детермінант, яка створює умови для росту та розвитку біологічного об'єкта відповідно до одного з можливих шляхів, закладених у його генетичній програмі.

Термін *детермінант* (*determinants, determinatio*) у біології означає процес визначення подальшого напрямку розвитку організму [59]. Латинське слово *determinatio* перекладається як «той, що визначає, обмежує» [65].

У середовищі *in vitro* детермінанти при мікроклональному розмноженні (МКР) регулюють процеси диференціації та дедиференціації, зокрема в меристематичних тканинах. Дослідження онтогенезу експлантів мигдалю показали, що за певних умов активуються як гени раннього розвитку, так і гени, характерні для пізніх стадій. «Ранні» гени беруть участь у регуляції метаболізму вуглецю та азоту, забезпечуючи як гетеротрофний, так і автотрофний способи живлення [87, 167].

Життєдіяльність організмів передбачає трансформацію речовин та енергії для формування тіла, де джерелом енергії можуть бути додані людиною первинні метаболіти (гетеротрофне живлення) або ж мінеральні елементи та світлова енергія (автотрофне живлення). Окрім цього, активуються механізми синтезу та процесингу білків. Гени, що визначають зрілий стан рослин, беруть участь у формуванні адаптаційних механізмів у відповідь на стресові фактори навколишнього середовища [133].

Трофічна детермінація мінеральними елементами. Вплив компонентів живильного середовища на розвиток організмів можна розділити на дві взаємопов'язані групи: мінеральні речовини та органічні сполуки, зокрема, первинні метаболіти або їх синтетичні аналоги. Детермінація першої групи відбувається відповідно до законів живлення, аналогічно до природних умов [33, 34, 57, 59, 62, 69, 84, 99].

У середовищі *in vitro* за наявності первинних метаболітів, рослинні об'єкти можуть виявити міксотрофний тип живлення, що означає переважання

гетеротрофного або автотрофного способу існування залежно від умов [18, 19, 22].

Для підтримки життєдіяльності, включаючи трансформацію речовин, енергетичний обмін і формування організму, джерелами енергії можуть бути як додані людиною первинні метаболіти (гетеротрофне живлення), так і мінеральні елементи у поєднанні зі світловою енергією (автотрофне живлення).

Співвідношення, концентрація та доступність мінеральних елементів визначають якісні та кількісні зміни, що впливають на ріст і розвиток рослин [7, 29, 44, 49]. Дослідження трофічної детермінації є складним завданням, оскільки мінеральні елементи не діють ізольовано, а взаємодіють між собою у вигляді синергізму, антагонізму або інших форм взаємозв'язку. Завдяки контрольованим умовам *in vitro* можна більш точно оцінити вплив окремих елементів і змодельовати процес детермінації онтогенезу [62].

Закон повернення поживних речовин можна сформулювати так: вміст мінеральних компонентів у живильному середовищі має максимально відповідати їхньому рівню в біологічних об'єктах. Спираючись на цей принцип, турецькі науковці [35] розробили нову методику створення живильних середовищ, засновану на аналізі запасних поживних речовин насіння.

Зокрема, були створені спеціалізовані живильні середовища: NAM (Nas almond medium) для культивування мигдалю [131] та NRM (Nas Read medium) для фундука [119, 132, 133, 151].

Як у природних умовах, так і в культурних системах *in vitro* нестача або недостатня доступність певного елемента впливає на рослину згідно із законом мінімуму [29].

Важливо враховувати, що як дефіцит, так і надлишок окремих елементів мінерального живлення можуть ускладнювати засвоєння інших, що є основою «закона оптимуму». Наприклад, у культур ожини та малини *in vitro* нестача Fe або його погане засвоєння (зокрема через підвищене рН) призводить до

розвитку хлорозів. Через низьку ефективність реутилізації заліза симптоми дефіциту першочергово з'являються на верхівках пагонів [21]. Подібні ознаки нестачі спостерігаються як у природних, так і в лабораторних умовах [80].

Водночас надмірний вміст заліза може спричиняти вітрифікацію [27], що посилюється за умов підкислення середовища та підвищеного рівня цитокінінів [31]. Крім того, надлишок Fe здатен пригнічувати засвоєння кальцію [131, 160].

У широко використовуваному живильному середовищі Мурасіге та Скуга, а також у багатьох інших культуральних середовищах, залізо вводять у формі хелату сульфату заліза: $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 27,80 мг/л (0,1 М) у комплексі з хелатуючим агентом Na_2EDTA (37,30 мг/л). Водночас різні культури мають індивідуальні вимоги до концентрації цього елемента в середовищі [63, 65, 76, 101, 123, 126, 137].

Дослідження культури мигдалю продемонструвало, що при зниженні концентрації заліза в живильному середовищі у 2 та 4 рази на тлі додавання KHCO_3 хлорозність суттєво посилювалася [65, 77, 80, 120, 124]. Водночас підвищений вміст Fe значно зменшував основні показники росту, зокрема довжину мікропагонів, проліферацію та накопичення сухої маси. Усі досліджені варіанти засвідчили, що зі збільшенням концентрації Fe засвоєння заліза та марганцю мікропагонами покращувалося, однак за високих рівнів цього елемента погіршувалося поглинання міді (Cu) та цинку (Zn) [65].

При розробці живильного середовища важливо враховувати еволюційні адаптації різних видів рослин до вмісту кальцію та його доступності в ґрунті. За цим критерієм рослини поділяють на три групи: кальцієфіли, кальцієфоби та нейтральні види. У загальному випадку дводольні рослини засвоюють більше кальцію, ніж однодольні [130, 147, 149].

До кальцієфільних культур належать мигдаль, а також, меншою мірою, волоський горіх і фундук. Однак надмірне внесення кальцію у живильне середовище у формі $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ або CaCl_2 може погіршувати поглинання інших

важливих елементів, зокрема нітрогену, заліза, фосфору, бору, марганцю, міді, цинку, калію, магнію та натрію [19, 22, 29, 115].

Тому створення живильного середовища, яке б одночасно забезпечувало підвищену концентрацію кальцію та не перешкоджало засвоєнню зазначених елементів, є складним завданням. Надійна діагностика дефіциту або надлишку кальцію можлива лише на четвертому та наступних пасажах [22], що не лише ускладнює процес, а й потребує значних витрат часу та ресурсів.

Серед мінеральних макроелементів нітроген відіграє значну роль завдяки своїм синергічним і антагоністичним взаємодіям [29, 115]. Зокрема, його надмірна кількість пригнічує засвоєння кальцію та спричиняє гіпергідратацію [31]. Регенеранти, культивовані на середовищах із підвищеним вмістом нітрогену, часто характеризуються надмірним потовщенням пагонів, укороченими міжвузлями та зниженим рівнем ризогенезу [65, 72, 111].

Особливу чутливість до надлишку нітрогену демонструють культури, що еволюційно адаптувалися до ґрунтів із низьким його вмістом, наприклад, ківі [22]. Для *Eucalyptus marginata* встановлено, що оптимальний розвиток пагонів і коренів відбувається за зниженого рівня амонійного азоту [87].

Вплив концентрації водневих (H^+) іонів на доступність поживних речовин. Важливе значення має також концентрація водневих іонів (H^+), яка впливає на доступність поживних речовин. Вплив нітрогену значною мірою залежить від його форми в живильному середовищі. Надмірна кількість амонійного азоту (NH_4^+), швидко вбудовуючись у структуру амінокислот, є одним із головних чинників розвитку гіпергідратації [22, 27, 46].

Під час культивування експлантів гібриду мигдалю та персика на середовищах MS і QL виявлено, що високий вміст NH_4NO_3 у поєднанні з цитокінінами, зокрема синтетичною формою БАП, пригнічував ріст пагонів. Спостерігалася значна кореляція між рівнем азоту, концентрацією гормонів, висотою рослин та масою утвореного калусу [40]. У природних умовах

токсичність амонійного азоту для мигдалю посилювалася при підвищенні температури понад 25°C [157].

Sabosche встановив, що морфогенез активується під впливом нітратної форми азоту навіть за її нижчої концентрації порівняно з амонійною. Надлишок амонію пригнічує активність нітратредуктази – ферменту, який бере участь у перетворенні нітратів [87].

Підвищений рівень NO_3^- сприяє синтезу цитокінінів спочатку в ризосфері, а згодом у всій рослині [6], причому цитокініни індукують синтез нітратредуктази [16, 17]. Водночас залучення нітратної форми (NO_3^-) до метаболічних процесів вимагає більше енергії та часу порівняно з амонійною формою.

Процес метаболізації азоту відбувається у такій послідовності: мінеральні нітрати середовища (NO_3^-) → перетворення ензимом нітратредуктазою в NO_2^- → подальше відновлення нітритредуктазою до NH_4^+ → включення в органічні сполуки [148]. Вибірковість засвоєння NO_3^- або NH_4^+ визначається рівнем кислотності середовища [65].

Співвідношення NH_4NO_3 та $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ у живильних середовищах впливає на довжину пагонів і кількість міжвузлів у фундука. Тривале культивування за умов надлишку азоту (N) та сірки (S) спричиняє гіпергідратацію та порушує засвоєння кальцію, що виявляється у скловидності тканин, укороченні пагонів і відмиранні верхівкових бруньок [169].

У регенерантів полуниці, авокадо та дуба співвідношення карбон/нітроген виявилося вищим порівняно з рослинами, що розвивалися *in vivo* [22]. Для картоплі з'ясовано, що середовище MS не було оптимальним за вмістом нітрогену та хлору. Його модифікація зі зниженням концентрації азоту сприяла покращенню росту пагонів, зокрема збільшенню кількості та довжини міжвузлів, підвищенню рівня хлорофілу та розміру листків. При низькому загальному вмісті азоту його амонійна форма мала незначний вплив на мікроклональне розмноження [5, 13, 23, 30].

Тривале культивування на середовищах із підвищеним умістом амонійного азоту посилює чутливість регенерантів до етилену, який накопичується в закритих культуральних ємностях. Це уповільнює ріст і пригнічує ризогенез. Тому на третьому етапі мікроклонального розмноження вміст азоту знижують, водночас підвищуючи концентрацію фосфору (P), калію (K) та кальцію (Ca) у середовищі [131, 133].

Нітроген і фосфор є основними мінеральними елементами, що суттєво впливають на ріст і розвиток рослин, особливо в умовах ізольованих культур [22, 44]. Азот сприяє збільшенню маси та об'єму рослин, але може сповільнювати якісні зміни, зокрема розвиток. Натомість фосфор відіграє ключову роль у прискоренні розвитку, оскільки бере участь у передачі енергії та генетичної інформації [111, 113]. Його високоенергетичні пірофосфатні зв'язки, зокрема в молекулі АТФ, є основними носіями енергії для клітинного метаболізму [29, 122].

Дефіцит фосфору або складнощі з його засвоєнням, наприклад у кислому середовищі, спричиняють загальну уповільнення розвитку рослин, а також порушень у формуванні листків (фоліогенез) та кореневої системи (ризогенез) [4, 52]. Крім того, за низького вмісту фосфору у поживному середовищі спостерігається зниження синтезу ендогенних цитокінінів [115].

У більшості живильних середовищ, зокрема й у формулі Мурасіге та Скуга, фосфор додається у вигляді однозаміщеного калій фосфату в концентрації 170 мг/л [19]. Водночас для окремих культур, зокрема кісточкових [1, 134, 136, 150, 153, 165, 166] і горіхоплідних, розроблено середовища з підвищеним умістом фосфорних сполук. Наприклад, у середовищі Куаріна-Лепувра його концентрація становить 270 мг/л [146], у DKW (Driver and Kuniyuki Walnut), призначеному для горіхоплідних культур, – 250 мг/л [92, 171], тоді як у NRM (Nas Read Medium) вона сягає 1300 мг/л [36, 37], а в NAM (Nas Almond Medium) – 1550 мг/л [133].

Калій є мінеральним елементом з найвищою концентрацією в клітинах: у цитоплазмі його рівень становить 100–200 мМ, а в хлоропластах – від 20 до

200 мм. Як одновалентний іон, він здатний швидко пересуватися на значні відстані як по ксилемі, так і по флоемі [122]. Калієві сполуки відіграють важливу роль в осмотичній регуляції, зокрема у підтриманні осмотичного тиску, тургору та процесах поглинання й транспорту води [19, 29]. Калій також впливає на активність понад 60 ферментів, сприяючи транспортуванню вуглеводів і фосфору. Його дефіцит може сповільнювати відтік вуглеводів, що призводить до ослаблення апікального домінування. Однією з можливих причин розеткової форми регенерантів є саме нестача калію [22, 29].

Магній відіграє важливу роль у регуляції метаболічних процесів, впливаючи на активність багатьох ферментів. Як центральний елемент порфіринового ядра хлорофілу, він бере участь у поглинанні світлової енергії та її передачі макроергічним сполукам [7, 8]. Окрім цього, магній допомагає підтримувати внутрішньоклітинний рН і баланс між катіонами та аніонами. У фотосистемах саме він є центральним атомом хлорофілу.

Mg^{2+} також відіграє важливу роль у процесі синтезу білка на різних рівнях. Він забезпечує зв'язок між двома рибосомними субодиницями, і за їхньої нестачі рибосоми дисоціюють, що спричинює припинення білкового синтезу. Магній також необхідний для функціонування РНК-полімераз та інших ферментів, залучених у синтез РНК, а його дефіцит блокує цей процес [29, 122].

Підвищена концентрація магнію, цинку та бору в середовищі Мурасіге і Скуга сприяла значному збільшенню сирової маси та вмісту води в регенерантах гібридів мигдалю та персика [161, 163, 166].

Серед мікроелементів, важливих для живлення мигдалю, особливу увагу слід приділити міді та цинку. Мідь у клітинах переважно входить до складу ферментних комплексів і відіграє важливу роль у перебігу окисно-відновних реакцій. Її нестача призводить до зниження активності мідьвмісних ферментів, що негативно впливає на клітинний метаболізм. Крім того, мідь бере участь у функціонуванні мітохондріального електронотранспортного ланцюга, забезпечуючи ефективне виробництво енергії.

Дефіцит міді знижує інтенсивність фотосинтезу та послаблює тургор клітин. Вона також виконує захисну функцію, оберігаючи клітини від впливу активних форм кисню, зокрема вільних радикалів [7, 29, 80, 83, 122, 135].

Цинк є ключовим металом-коферментом: він входить до складу одних ферментів, а активність інших регулює. Важливе значення цей елемент має для процесу синтезу білка, а його нестача сповільнює цей процес. Дефіцит цинку спричиняє дезінтеграцію рибосом, через що в клітинах накопичуються амінокислоти та амід, які не залучаються до метаболізму [122]. Окрім того, цинк впливає на активність РНК-полімерази та ферментів, що беруть участь у перетворенні триптофану на індолілоцтову кислоту [29, 49].

При зменшенні концентрації мінеральних елементів у поживному середовищі (наприклад, у варіантах MS 1/2 або MS 1/4) стимулює коренеутворення, проте ріст регенерантів при цьому сповільнюється [19, 44]. Якщо материнські рослини-донори вирощують у таких умовах, їхнє потомство також розвивається повільніше [22].

Мінеральні елементи складають приблизно 5 % сухої маси, тоді як основну її частину формують органогенні елементи – вуглець (C), водень (H), азот (N) і кисень (O) [7]. Нітроген не лише входить до складу органічних сполук, але й впливає на надходження, транспортування та засвоєння інших елементів. Важливу роль також відіграє концентрація іонів гідрогену, яка визначає рівень рН середовища. Цей показник впливає на численні життєві процеси, зокрема осмолярність, електропровідність, біологічну активність клітин та їхню поведінку [52, 159].

У павловнії як у природних умовах (*in vivo*), так і в культурі *in vitro*, надмірне підвищення кислотності ґрунту або живильного розчину до токсичних значень (рН 4,0–5,5) перешкоджає засвоєнню та доступності таких елементів, як фосфор (P), калій (K), сірка (S), кальцій (Ca) і магній (Mg) [22, 55, 159]. Навіть за достатнього рівня поживних речовин у рослин можуть проявлятися ознаки їхнього дефіциту, зокрема уповільнення росту, надмірне накопичення вологи в листках, їхнє темне забарвлення із синьо-фіолетовим

відтінком і вираженим блиском [19, 55]. Підкислення середовища особливо несприятливо впливає на процес коренеутворення (ризогенез) [11, 52].

Водночас підвищення рН до нейтральних або лужних рівнів ускладнює засвоєння та метаболізм азоту (N) і заліза (Fe) [44]. Доступність поживних елементів тісно пов'язана з концентрацією іонів гідрогену (H^+) і визначає їхню регуляторну роль у гормонально-трофічному забезпеченні онтогенезу [19, 22].

Вплив органічних компонентів середовища на онтогенез. У природних умовах більшість рослин у складі агрофітоценозів живляться автотрофним способом, тобто, синтезують органічні речовини з неорганічних, використовуючи енергію Сонця. Надходження органічних сполук у рослину є настільки незначним, що ним можна знехтувати (наприклад, амінокислотами та амідами, які утворюються внаслідок розкладу органічних залишків в ґрунті).

В умовах *in vitro* рослини засвоюють із живильного середовища різні органічні сполуки, серед яких вуглеводи, амінокислоти та їх похідні, вітаміни й фітогормони. Окремі рецептури також передбачають додавання органічних компонентів із невизначеним складом, таких як гідролізат казеїну, кокосове молоко чи гомогенат м'якоті банана [19, 22, 26, 29]. Усі ці речовини належать до первинних або вторинних метаболітів. Первинні виконують дві ключові функції: вони є джерелом енергії та/або будівельним матеріалом для синтезу нових сполук і формування анатомічних структур [7, 8]. Вторинні метаболіти, своєю чергою, беруть участь у регуляторних і захисних процесах, виконуючи спеціалізовані функції, які не притаманні первинним метаболітам [29].

За кількісним умістом у більшості живильних середовищ переважають вуглеводи, що виконують не лише енергетичну функцію, а й слугують структурним матеріалом у процесах онтогенезу рослин. Найчастіше застосовують дисахарид сахарозу ($C_{12}H_{22}O_{11}$), рідше – моносахариди, наприклад, глюкозу (як у середовищі DKW), а в окремих випадках – полісахариди, такі як картопляний або кукурудзяний крохмаль [19, 22, 25, 26].

Сахароза та інші первинні метаболіти також чинять рістрегулюючий вплив. Її концентрація визначає розвиток вегетативних органів, зокрема

листіків і кореневої системи [22], а також сприяє формуванню запасуючих структур [79]. Зазвичай сахарозу додають до живильного середовища в концентрації 3 % (30 г/л) [19, 122]. Однак дослідження Gürel Songül і Gülşen Yücel [102] виявили, що у мигдалю (*Amygdalus communis* L.) підвищення концентрації сахарози до 5–6 % сприяло активнішому розмноженню пагонів і прискореному росту.

1.5. Гормональна детермінація

Гормони, як вторинні метаболіти, присутні в рослинах у значно нижчих концентраціях, ніж мінеральні або інші органічні сполуки. Наприклад, якщо в живильному середовищі сахароза може міститися в кількості 30 г, то вміст гормонів вимірюється лише міліграмами. Співвідношення між цими речовинами відрізняється в тисячі, а інколи й у десятки тисяч разів. Оскільки гормони не є джерелом енергії чи будівельним матеріалом, їхня головна функція полягає у запуску певних генетичних програм у потрібний момент, а в біотехнологіях – ще й відповідно до технологічних вимог [8, 19, 29, 162].

В умовах *in vitro* необхідно штучно стимулювати процеси, що відповідають вимогам конкретної технології культивування. Як правило, рівень ендогенних гормонів у культурі тканин є недостатнім для більшості біотехнологічних методів [22, 26, 34, 98]. Тому застосовують додаткову гормональну регуляцію та інші детермінуючі фактори розвитку рослинних об'єктів. Найчастіше використовують синтетичні аналоги природних фітогормонів, оскільки вони є більш доступними та стабільними.

Цитокініни. У мікроклональному розмноженні здебільшого використовують синтетичні гормони двох основних класів: ауксини та цитокініни. Гібереліни застосовують рідше і лише в окремих випадках [19, 26, 44, 48]. Відкриття цитокінінів стало важливим кроком у розвитку методів мікроклонального розмноження [6, 19, 30, 91].

Цитокініни стимулюють клітинний поділ, синтез РНК і збільшення кількості рибосом [6, 53]. Вони також сприяють утворенню бічних і

адвентивних бруньок, усуваючи апікальне домінування [19, 29, 155]. При цьому синтетичні аналоги цитокінінів, хоч і подібні за структурою до природних, можуть мати різний детермінуючий вплив. Це пояснюється відмінностями у бічних ланцюгах їхніх молекул [6].

Якщо концентрація цитокінінів у живильному середовищі перевищує рівень ауксинів, замість одного-двох домінантних пагонів формується скупчення дрібніших пагонів. Це явище зумовлене зміною донорно-акцепторних взаємовідносин [19, 22, 29, 31, 44, 53]. Оскільки основна частина асимілятів спрямовується на розвиток пагонів, коренева система формується слабше або взагалі не розвивається [22]. Крім того, надлишок цитокінінів гальмує транспорт ауксинів у базальні частини експлантів [170].

Окрім участі в автотрофному живленні, цитокініни відіграють ключову роль у процесі ювенілізації [22]. Використання їхніх синтетичних аналогів має обмеження щодо концентрації в живильних середовищах, оскільки надмірний вміст цих гормонів може спричиняти фітотоксичний ефект і накопичуватися протягом кількох поколінь вегетативного розмноження [22, 29, 31, 44, 53].

Найвищі рівні цитокінінів у культурі *in vitro* застосовують під час стадії мультиплікації в мікральному розмноженні (МКР), а також для індукції калусогенезу [30, 33, 170].

Серед синтетичних цитокінінів, що використовуються у МКР, найбільш поширеним є 6-бензиламінопурин (БАП), який відіграє важливу роль у розвитку пагонів на пізніх етапах культивування. Однак перевищення оптимальної концентрації (2,0–3,0 мг/л) може негативно впливати на рослини.

Дослідження Eddo Rugini та Devi Verma продемонстрували ефективність 0,7 мг/л БАП у поєднанні з 0,01 мг/л α -нафтилоцтової кислоти на стадії мультиплікації [149]. Isikalan Cigdem та його співавтори використовували 0,5–1,0 мг/л БАП для стимуляції утворення конгломератів пагонів [105]. Своєю чергою, Aabood Sajida визначив, що оптимальними умовами для проліферації та подовження пагонів мигдалю є 1,0 мг/л БАП у комбінації з 0,1 мг/л індолілмасляної кислоти. Перевищення цих значень (2 мг/л БАП та 0,5 мг/л

індолілмасляної кислоти) спричиняло формування невеликої кількості мертвого калусу біля основи пагонів [77].

Схожі результати отримали китайські вчені, однак вони також відзначили сортові особливості мигдалю. Наприклад, оптимальним середовищем для проліферації сорту *Shache 18* було МС із додаванням 1,25 мг/л БАП, 0,2 мг/л індолілмасляної кислоти та 0,2 мг/л нафтилоцтової кислоти. Для сорту *Пебадан* найкраще підходило середовище МС із 1,0 мг/л БАП, 0,3 мг/л індолілмасляної кислоти та 0,1 мг/л нафтилоцтової кислоти [82].

Ауксини. Індоліл-3-оцтова кислота (ІОК) є найпоширенішою природною формою ауксину, одним із шляхів її синтезу є перетворення амінокислоти триптофану [53]. У мікроклональному розмноженні (МКР) застосовують як синтетичні аналоги ІОК, так і сполуки, що в рослинах трансформуються в природний ауксин. До таких належать нафтилоцтова кислота та індолілмасляна кислота, зокрема остання є більш стабільною до впливу температури та світла, що робить її зручнішою для біотехнологічного використання [19, 34, 122].

Згідно з правилом Скуга-Міллера, якщо концентрація ауксинів у живильному середовищі перевищує рівень цитокінінів, це сприяє індукції апікального домінування та активізує процес коренеутворення. Тому на третьому етапі МКР (індукція ризогенезу *de novo*) ауксини додають у підвищених концентраціях. Якщо ж необхідно стимулювати калусоутворення, застосовують високі рівні як ауксинів, так і цитокінінів [29].

Для стимуляції формування кореневої системи у регенерантів мигдалю E. Rugini та D. C. Verma використовували комплексний підхід: у живильному середовищі знижували концентрацію мінеральних елементів удвічі, підвищували вміст агару з 0,7 % до 0,9 %, а також додавали 1 мг/л нафтилоцтової або 1 мг/л індолілмасляної кислоти. Після ініціювання ризогенезу регенеранти пересаджували у вермикуліт [149].

У дослідженнях С. Isikalan та його колег для стимуляції коренеутворення у мигдалю (*Amygdalus communis* L.) сорту Nonpareil до

живильного середовища додавали 8,0 мг/л індоліл-3-оцтової кислоти, при цьому концентрацію мінеральних елементів також зменшували удвічі [105]. К. Kamali, прагнучи посилити ефект ІОК, витримував експланти в темряві протягом 7 днів [109]. Ймовірно, затемнення могло сприяти синтезу або активації ендогенних гіберелінів. У свою чергу, С. Tsipouridis та Т. Thomidis у своїх дослідженнях додавали екзогенний гіберелін ГКз у живильне середовище для гібрида персика та мигдалю (GF677), що допомогло усунути розетковість і покращити ризогенез [48, 161, 166, 169].

1.6. Переформатування детермінант

Пристосування рослин до нових умов на різних етапах мікроклонального розмноження (МКР) може позначатися різними термінами, такими як аклімація, акліматизація [141, 142], реадаптація [28] та постасептична адаптація [22]. У процесі розмноження *in vitro* рослини зазнають змін у системах детермінації при переході між етапами МКР.

Вже на підготовчому (нульовому) етапі маточні рослини переводять у закритий ґрунт із розсіяним освітленням, проводять декапітацію, стимулюючи обрізку, а в деяких випадках обробляють гормонами, зокрема гіберелінами [19, 57, 44, 49].

Найбільш значні зміни відбуваються під час переходу між умовами *in vivo* та *in vitro*. Спочатку рослини переходять із природного або польового середовища, де живляться автотрофно, до міксотрофних умов, де домінує гетеротрофне живлення з впливом екзогенних гормональних факторів. На заключному, четвертому етапі (реадаптація до умов відкритого ґрунту, *ex vitro*) відбувається зворотна перебудова механізмів регуляції онтогенезу.

Зміни в системі детермінації також спостерігаються на проміжних етапах МКР, що відбуваються виключно *in vitro*. У період між введенням первинних експлантів і формуванням стабільної культури здійснюється координація ендогенних і екзогенних детермінант, а їх оптимальне поєднання

визначає успішність подальшого культивування. Оцінку стабільного розвитку можна проводити після 4–6 живцевих поколінь на живильному середовищі.

Перебудова також відбувається під час переходу від стадії мультиплікації (другий етап МКР) до етапу індукції коренеутворення. Тривале культивування на середовищах із підвищеним вмістом цитокінінів може пригнічувати ризогенез на третьому етапі [11, 44]. Крім того, надмірна ювенілізація, спричинена гетеротрофним живленням та впливом цитокінінів, може ускладнювати адаптацію рослин на завершальному етапі МКР [22, 28].

Висновки до розділу 1

Детермінація онтогенезу рослинних об'єктів, зокрема експлантів і регенерантів мигдалю, є ключовим фактором у регулюванні їх розвитку відповідно до технологічних вимог. Для створення ефективних технологій мікроклонального розмноження мигдалю необхідне комплексне дослідження специфіки детермінант цього процесу.

За матеріалами досліджень розділу 1 опубліковано 5 наукових праць [24, 59, 122, 69, 57].

РОЗДІЛ 2

УМОВИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Етапи проведення досліджень

Дослідження відповідно до основних етапів технологічного процесу МКР мигдалю (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb) проводили в 4 етапи за принципом «Step by Step», тобто, найкращий результат попереднього дослідів зазвичай слугував основою або контрольною точкою для наступного експерименту.

Основні етапи технологічного процесу:

- підготовка материнських рослин-донорів, отримання первинних експлантів та введення їх у культуру *in vitro* – формування стерильної культури;
- мультиплікація – багаторазове субкультивування із високим коефіцієнтом розмноження;
- індукція коренеутворення – стимуляція ризогенезу для формування кореневої системи;
- постасептична адаптація – переведення рослин із стерильних умов лабораторії в природне середовище.

Перший етап розпочинається у спеціалізованих спорудах закритого ґрунту, тоді як весь четвертий етап також проводиться в контрольованих умовах адаптаційних теплиць. Стадії введення в асептичні умови, розмноження та подальша адаптація ризогенезу *in vitro* виконуються в умовах біотехнологічних лабораторій із дотриманням стерильності [74].

Підготовка материнських рослин-донорів та отримання стерильної культури. На початковому етапі проводиться відбір здорових, генетично однорідних материнських рослин, які використовуються як донори експлантів [4]. Основною метою цього етапу є отримання стерильної та морфогенної культури *in vitro*.

Вихідним матеріалом можуть бути:

- апікальні та бокові бруньки;

- верхівкові сегменти пагонів;
- фрагменти листків, черешків, суцвіть, кореневих тканин або гіпокотиль пророслого насіння.

Оскільки експланти схильні до ендогенної контамінації та окиснення фенольних сполук, необхідно проводити попередню обробку донорських рослин. Для цього застосовують:

- антиоксиданти (аскорбінова кислота, активоване вугілля);
- стерилізаційні розчини (гіпохлорит натрію, перекис водню);
- методи мінімізації стресу, що знижують ризик некрозу тканин.

Дотримання всіх вимог цього етапу забезпечує високу якість культури *in vitro* та її здатність до подальшої проліферації.

2.2. Кратність дослідів та об'єми вибірок

Рослини-донори експлантів культивували в умовах закритого депозитарію. Асептичне культивування проводили у прозорих ємностях загальним об'ємом 250 мл, що забезпечувало належні умови для розвитку рослинного матеріалу. Розмір вибірок *ex vitro*: одне повторення становила одна теплична касета з рослинами.

На етапі первинного введення експлантів в асептичні умови, до кожної окремої ємності висаджували лише один експлант, що дозволяло уникнути перехресного зараження та забезпечувало точність спостережень [45]. На наступних етапах дослідження до кожної ємності висаджували по п'ять експлантів, а середні значення показників, отримані для кожної ємності, розглядалися як окреме біологічне повторення.

Розмір вибірки для досліджень *in vitro* становив 50 облікових рослинних об'єктів, до яких входили як експланти, так і регенеранти. Експерименти проводили з повторюваністю чотири рази в різні проміжки часу, що забезпечувало достовірність результатів та дозволяло враховувати варіації, пов'язані з часом проведення дослідів (рис. 2.1).



Рис. 2.1. Експланти введені в асептичні умови

2.3. Місце проведення досліджень та вихідний матеріал

Дослідження проводили у міжкафедральній лабораторії біотехнології рослин Білоцерківського національного аграрного університету МОН України в період 2021–2024 років, а також на виробничих потужностях ТОВ «Благодатне» ТМ «Тевітта» (Черкаська обл.) та ФГ «Беррі Фарм Юкрейн» (Волинська обл.), які спеціалізуються на розмноженні та вирощуванні різних видів рослин.

Як вихідний матеріал для досліджень використовували однорічні рослини щепленого солодкого мигдалю, відібрані з вітчизняних сортів

селекції та виробництва фермерського господарства ім. Академіка Унанова: Е- 5 Борозан, М 41 Алекс, Джорджия, Луїза.

Материнські рослини *in vivo* вирощували в умовах закритого ґрунту зі штучно створеним мікрокліматом.

2.4. Особливості умов асептичного культивування

Рослинні об'єкти *in vitro* вирощували у скляних банках, закритих прозорими поліпропіленовими кришками згідно із загальноприйнятими методиками [19], та рекомендаціями розробленими А.А. Подгаєцьким та В.В. Мацкевичом [23, 44] у лабораторіях та теплицях ФГ «Беррі Фарм Юкрейн», лабораторії Білоцерківського національного аграрного університету (рис. 2.2).



Рис. 2.2. Культивування рослинних об'єктів в ємностях об'ємом 0,25 л

Температура культивування $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Інтенсивність освітлення для об'єктів *in vitro* становила 2,2 kLux, з фотоперіодом 16 годин світла та 8 годин темряви.

2.5. Підготовка донорів експлантів та деконтамінація первинних експлантів

На підготовчому етапі було застосовано комплекс заходів, розроблений В.В. Мацкевичем і його колегами для фундука [9, 24, 32, 151]. Відповідно до цієї методики, донорів первинних експлантів вирощували в закритому приміщенні («депозитарії») зі штучним розсіяним освітленням (1,5–2,5 kLux).

У «депозитарії» регулярно проводили оброблення від шкідників, таких як попелиці, кліщі та трипси. Після пробудження рослин здійснювали декапітацію верхівок, щоб стимулювати розвиток бічних бруньок.

Крім того, для профілактики вірусних інфекцій та інших збудників хвороб застосовували фунгіциди й інсектициди. Починаючи з моменту висадки рослин-донорів і до ізоляції первинних експлантів, кожні два тижні проводили фунгіцидні оброблення.

З метою усунення екзогенного мікробіологічного забруднення первинні експланти мигдалю піддавали обробці дезінфікуючими засобами. Попередньо експланти ретельно промивали у проточній воді для видалення механічних забруднень. Деконтамінацію продили за допомогою контактних антисептиків або їхньої комбінації з антибіотиками, фунгіцидами та біоцидами [9, 12, 42, 43, 78]. Для усунення екзогенного мікробіологічного забруднення серед контактних засобів застосовували препарати, що містять ртуть і хлор [58], зокрема гіпохлорити кальцію або натрію [18, 19, 20].

Більш ефективним методом виявилася деконтамінація за допомогою вітчизняного препарату Бланідас 300 (натрієва сіль дихлорізоціанурової кислоти – 80,52%). Порівняно з гіпохлоритами, він не лише підвищував відсоток первинних експлантів, вільних від контамінації, а й зменшував кількість випадків загибелі експлантів через опіки, спричинені стерилізуючими агентами [12, 19, 43, 44, 73].

2.6. Базові середовища

Трофічна детермінація досліджувалася на низці середовищ з різним умістом як мінеральних, так і органічних компонентів [61, 63, 68]. Основні базові середовища, застосовані в дослідженнях представлено в (табл. 2.1)

Таблиця 2.1

Склад базових середовищ, використаних в дослідженнях, мг/л

[92, 128, 132, 133, 146]

Компонент, мг/л	MS _{мод.}	QL _{мод.}	DKW _{мод.}	NAM _{мод.}	NRM _{мод.}
NH ₄ NO ₃	1650,0	400,0	1416,0	900	530
KNO ₃	1900,0	1800,0	-	250	550
KH ₂ PO ₄	170,0	270,0	265,0	1550	1300
MgSO ₄ ×7H ₂ O	370,0	360,0	740,0	2050	1650
K ₂ SO ₄	-	-	1600,0	-	-
Ca(NO ₃) ₂ ×4H ₂ O	-	833,8	1365	1050	700
CaCl ₂ ×2H ₂ O	440,0	-	150	45	90
FeSO ₄ ×7H ₂ O	27,80		33,8	-	
Na ₂ ЕДТА×2H ₂ O	37,3		45,4	-	
Ferrilene 4.8 Orto-Orto	-			114,63	
MnSO ₄ ×4H ₂ O	22,3	0,76	33,5	6,0	20,0
H ₃ BO ₃	6,2		4,80	11,0	6,5
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	8,6		-	11,0	8,8
Zn(NO ₃) ₂	-		17,0	-	-
CuSO ₄ ×5H ₂ O	0,025		0,25	3,2	2,5
Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O	0,25		0,39	0,1	2,5
CoCl×6H ₂ O	0,025		-		
KJ	0,83	0,08	-		
NiSO ₄ ×6H ₂ O	-		0,0053	-	
БАП	1,5 при введенні, мультиплікації та 0,3 при ризогенезі				
ІМК	0,3 при введенні, мультиплікації та 1,5 при ризогенезі				
Вітамін В ₁	1,0				
Вітамін В ₆	0,6				
Вітамін РР	1,0				
Вітамін С	3,0				
мезоінозитол	100,0				
гліцин	1,0				
Сахароза/глюкоза:	сахароза 30×10 ³ мигдаль; глюкоза 15×10 ³ фундук				

Примітка: «мод.» відповідає «модифіковане».

Живильні середовища готували, взявши за основу класичні прописи Murashige і Skoog (MS), Quirin і Lepoivre (QL), Driver і Kuniyuki Walnut (DKW) [63, 92, 128, 146], Nas Almond Medium (NAM), Nas Read Medium (NRM) [132, 133]. Кислотність (pH) для мигдалю перед автоклавуванням доводили до 5,9–6,0. Освітлювальний період – 16 годин на добу. Інтенсивність освітлення – 2200 люкс. Температура культивування – $24,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$.

2.7. Характеристика синтетичних гормонів

Синтетичні гормони – це хімічно створені аналоги природних гормонів, які використовуються для регулювання фізіологічних процесів у рослин і тварин. У рослинництві вони відіграють ключову роль у стимуляції росту, розвитку, адаптації до стресів і підвищенні продуктивності культур.

Аналоги індоліл-3-оцтової кислоти (ІОК) поділяються на три основні групи:

1. Похідні індолу. До цієї групи належать індоліл-3-пропіонова (ІПК) та індоліл-3-масляна кислота (ІМК). Хоча ці сполуки рідко зустрічаються в природі, вони проявляють певну ауксинову активність. ІМК має підвищену стійкість до розпаду в тканинах і широко застосовується для стимулювання коренеутворення. Серед похідних ІОК отримано низку аліфатичних гомологів, які відрізняються парною або непарною кількістю атомів вуглецю в бічному ланцюзі, розташованому в С-3-положенні. Подовження цього ланцюга знижує активність сполук, проте гомологи з парною кількістю атомів вуглецю демонструють вищу ефективність.

2. Хлорзаміщені феноксипохідні. До цієї категорії належать сполуки, такі як 2,4-дихлорфеноксиоцтова (2,4-Д) та 2,4,5-трихлороцтова кислота (2,4,5-Т). Їхня висока біологічна активність зумовлена стійкістю до розпаду та здатністю до зв'язування. Оскільки фермент ІОК-оксидаза, який зазвичай розщеплює ІОК, не може окислювати ці сполуки, 2,4-Д і 2,4,5-Т ефективно діють як регулятори росту.

3. Похідні нафтилалкілкарбонових кислот. До цієї групи належать 1-нафтилоцтова кислота (1-НОК), її калієва сіль (K_2O) і 2-нафтилоцтова кислота (2-НОК). 1-НОК має високу здатність проникати в рослинні тканини та ефективніше пересувається в них порівняно з 2,4-Д. Вона також має більшу стійкість у тканинах, ніж ІОК.

Ці групи аналогів ІОК використовуються в різних біотехнологічних і сільськогосподарських практиках для регуляції росту рослин.

2.8. Особливості індукції ризогенезу *in vitro* та постасептичної адаптації

Процес коренеутворення (ризогенез *in vitro*) є критично важливим для формування життєздатних мікроклональних рослин. Він здійснюється шляхом додавання до живильного середовища ауксинів, зокрема, нафтилоцтової кислоти (НОК), індоліл-3-оцтової кислоти (ІОК), індоліл-3-масляної кислоти (ІМК). Оптимальне співвідношення та концентрація цитокінінів і ауксинів у живильному середовищі регулюють ріст і розвиток рослин *in vitro*, стимулюючи коренеутворення. У дослідженнях використовували препарати, виробника компанії Merck KGaA, Дармштадт, Німеччина, та її філій. Враховували чистоту речовини, форму випуску та рекомендації щодо застосування. Маточні розчини готували згідно відповідних концентрацій для використання в культурі *in vitro*. Оскільки всі ауксини погано розчиняються у воді, то їх індоліл-3-оцтової кислоти (ІОК), індоліл-3-масляної кислоти (ІМК) та нафтилоцтової кислоти (НОК) спочатку розчиняли в невеликій кількості розчину $Ca(OH)_2$, а потім доводили до відповідного об'єму дистильованою водою. Наважки ауксинів брали вагою по 100 мг, об'єм дистильованої води доводили до 100 мл. Робочі розчини готували розведенням концентрованого розчину перед використанням.

На середовищі NAM були протестовані різні концентрації ІМК як фактор, що визначає ризогенез мигдалю в умовах *in vitro*. У контрольному варіанті ІМК не додавали, а фонові концентрації БАП становили 0,125 мг/л.

Серед досліджених концентрацій синтетичного аналога ауксину – індолілмасляної кислоти (ІМК) (0 – контроль; 0,125 мг/л; 0,250 мг/л; 0,500 мг/л; 0,750 мг/л; 1,000 мг/л; 1,250 мг/л) на фоні 0,125 мг/л БАП, для досліджуваних сортів найкращий показник коренеутворення було досягнуто за концентрації ІМК 0,750 мг/л у штучному живильному середовищі.

За нижчих концентрацій ІМК показники коренеутворення були слабшими. Збільшення концентрації ІМК від 0,750 до 1,000 мг/л не призводило до суттєвого підвищення інтенсивності ризогенезу. При застосуванні більш високих концентрацій ІМК спостерігалось уповільнення коренеутворення, що, на нашу думку, пов'язано з фітотоксичною дією цих концентрацій [22, 23, 46].

Коренева система, що утворилася в умовах *in vitro*, відрізняється підвищеною чутливістю до змін зовнішнього середовища, тому наступний етап є особливо важливим для успішного розвитку рослин.

Завершальний етап, адаптація, є найбільш відповідальним, оскільки перехід мікроклональних рослин зі стерильних умов лабораторії в природне середовище (*ex vitro*) супроводжується значним стресом, що може призвести до загибелі значної частини рослинного матеріалу [22, 45, 77].

Процес постасептичної адаптації регенерантів *in vitro* передбачає кілька етапів, спрямованих на успішне переведення рослин із стерильних умов у природне середовище.

На першому етапі здійснювалася підготовка рослинного матеріалу. Для цього використовували 30-денні регенеранти, вирощені *in vitro*.

Важливим елементом була підготовка субстрату, який повинен забезпечувати оптимальну аерацію та водозабезпечення. Рекомендоване співвідношення компонентів субстрату – перліт і кокосове волокно у пропорції 1:1. Перед висадкою відрегулювали рН субстрату до 6,0 за допомогою розчину КОН [100].

Під час адаптації рослин створювали вологі камери у вигляді мікропарників, вкритих тонкою стрейч-плівкою, які допомагали підтримувати

високу вологість (85 %) і стабільний мікроклімат [77]. У плівці залишали отвори для вентиляції. Щоденне провітрювання запобігало утворенню плісняви. Вологі камери зменшували стрес для рослин, запобігали пересиханню та сприяли швидшому укоріненню.

Далі здійснювалася висадка рослин у горщики Р 9 (0,5 л об'єм). Полив проводили розчином мінеральних елементів, що містили макро- і мікроелементи, включаючи кальцій та залізо, згідно зі схемою NAM.

Важливим фактором є правильний світловий режим. Інтенсивність освітлення становила 4,4 Klux при фотоперіоді 16 годин світла і 8 годин темряви. Для цього використовували люмінесцентні або світлодіодні лампи, розташовані на відстані 25-30 см від рослин.

Температурний режим відігравав ключову роль у процесі адаптації. Оптимальна температура складала 22-24 °C. При зниженні температури нижче 18 °C відбувалося уповільнення ростових процесів, а при перевищенні 30 °C активізувалося інтенсивне дихання без відповідного фотосинтезу, що може негативно вплинути на адаптацію рослин.

Контроль вологості повітря здійснювався шляхом підтримки рівня 85 % на початковому етапі з поступовим зниженням до 75 % через 7-10 днів. Для цього використовують зволожувачі повітря або проводили періодичне обприскування водою.

Важливим аспектом був вплив ендогенних факторів. Культивування *in vitro* на середовищах із балансом ауксинів та цитокінінів значно впливало на приживлюваність. Найкращі результати досягаються при використанні середовища з БАП 0,125 мл/л та ІМК 0,75 мл/л.

Через 30 днів після первинної адаптації рослини пересаджували у горщики об'ємом 1-2 л. Використовували субстрат на основі перліту та кокосового волокна у співвідношенні 1:1, що сприяв кращому розвитку кореневої системи. Полив здійснювався помірно, з поступовим переходом до традиційних методів догляду.

Після 60-90 днів адаптації рослини висаджували у відкритий ґрунт. Важливо забезпечити ґрунт із хорошою аерацією та достатнім вмістом органічних і мінеральних добрив. Найбільш сприятливими умовами для висадки були температура 20–25 °С, регулярний полив і захист від прямих сонячних променів протягом перших 7–10 днів.

Оцінка ефективності адаптації базувалася на таких критеріях: приживлюваність понад 80 %, приріст кореневої системи понад 95 мм, приріст пагонів понад 70 мм, збереження природного забарвлення листків і стебел. Використання цієї методики забезпечувало високий рівень адаптації регенерантів *in vitro*, сприяючи формуванню стійкої кореневої системи та вегетативного апарату, що необхідно для подальшого культивування.

Висновки до розділу 2

Висвітлено технологічні етапи процесу МКР, включаючи підготовку експлантів, деконтамінацію, мультиплікацію *in vitro*, індукцію коренеутворення та адаптацію *ex vitro*. Особливу увагу приділено принципу покрокового виконання дослідів.

Зазначено кратність дослідів, об'єми вибірок для *in vitro* та *ex vitro* умов, а також їх повторюваність.

Описано місця проведення досліджень (зокрема, лабораторії Білоцерківського національного аграрного університету, також виробничі потужності ТОВ «Благодатне» ТМ «Тевітта» (Черкаська обл.) та ФГ «Беррі Фарм Юкрейн» (Волинська обл.) і характеристику вихідного матеріалу, використаного в експериментах.

Детально описано умови асептичного культивування, особливості складу живильних середовищ і застосування синтетичних гормонів для стимуляції росту, мультиплікації та коренеутворення.

За матеріалами досліджень розділу 2 опубліковано 3 наукові праці [61, 63, 68].

РОЗДІЛ 3

ДЕКОНТАМІНАЦІЯ ТА ДЕТЕРМІНАЦІЯ ОНТОГЕНЕЗУ

ПЕРВИННИХ ЕКСПЛАНТІВ

3.1. Вплив підготовки материнських рослин на виділення фенолоподібного ексудату первинними експлантами

Ефективність мікроклонального розмноження (МКР) визначається успішним проходженням кожного з його етапів, оскільки результати попередніх стадій впливають не лише на стан рослинних об'єктів, а й на подальший розвиток процесу, визначаючи як наукову, так і комерційну ефективність технології. Зокрема, на підготовчому та початковому етапах виникають проблеми, без усунення яких подальша мультиплікація та наступні стадії стають неможливими. Основні перешкоди включають:

- зовнішнє та внутрішнє забруднення.
- самоотруєння, викликане окисненням фенолоподібних сполук;
- переформатування детермінант у процесі переходу рослинних об'єктів між різними умовами вирощування: відкритий ґрунт – закритий ґрунт (депозитарій) – *in vitro*.

Перші зміни умов спостерігаються при перенесенні донорських рослин у закритий ґрунт, що супроводжується зниженням інтенсивності освітлення та зміною спектрального складу світла, зокрема, майже повною відсутністю ультрафіолетової складової. Інтенсивність освітлення безпосередньо впливає на вивільнення первинними експлантами продуктів окиснення фенольних сполук [80].

Декапітація верхівок у материнських рослинах змінює донорно-акцепторні взаємозв'язки, що веде до втрати апікального домінування. Як наслідок, знижується синтез ауксину верхівковою брунькою, що послаблює її пригнічувальний вплив на нижчі бруньки [53].

Хоча у мигдалю процес фенолоутворення менш виражений, ніж у деяких інших культур [122], було досліджено вплив підготовки материнських рослин на рівень самоінтоксикації, спричиненої окисненням фенолоподібних сполук,

під час висадки первинних експлантів на п'ять різних типів живильних середовищ (MS, QL, DKW, NAM, NRM) [9, 92, 128, 132, 133, 146]. Для деконтамінації використовували розчин натрій гіпохлориту (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Відсотковий рівень самоінтоксикації первинних експлантів залежно від типу живильного середовища та умов вирощування донорних рослин мигдалю*

Сорт / середовище	MS	QL	DKW	NAM	NRM
Е5 Борозан	23/12	6/2	21/18	6/1	8/3
М41 Алекс	19/12	5/2	12/9	0/0	7/2
Джорджия	14/10	3/1	11/9	0/0	4/0
Луїза	8/6	-	6/5	0/0	1/0

*Примітка: у чисельнику наведено рівень самоінтоксикації експлантів, ізольованих від материнських рослин, вирощених у польових умовах (контроль), а в знаменнику – від рослин, вирощених у депозитарних умовах.

У ході активного експерименту було встановлено, що підготовка донорських рослин сприяє зниженню кількості первинних експлантів, які виділяли фенолоподібні сполуки. Крім того, важливу роль відігравали елементи живлення [3], концентрація яких варіювалася залежно від складу поживного середовища. Найменшу кількість експлантів із фенольним ексудатом зафіксовано на середовищах NAM та NRM, що відрізняються відносно низьким рівнем нітрогену як у амонійній, так і в нітратній формах (табл. 3.2). Водночас середовище DKW містило найвищу концентрацію сульфору [22, 29, 49].

Таблиця 3.2

Нітрогеновмісні солі в середовищах залучених у дослідженнях

Компонент, мг/л	MS _{мод.} *	QL _{мод.}	DKW _{мод.}	NAM _{мод.}	NRM _{мод.}
NH ₄ NO ₃	1650,0	400,0	14160	900	530
KNO ₃	1900,0	1800,0	-	250	550
K ₂ SO ₄	-	-	1600,0	-	-
Ca(NO ₃) ₂ ×4H ₂ O	-	833,8	1365	1050	700
CaCl ₂ ×2H ₂ O	440	-	112,50	45	90

* Примітка: «мод.» відповідає «модифіковане».

Припускається, що високий рівень нітрогену підвищує проникність мембран, що сприяє вивільненню фенолоподібних сполук [29, 53]. Крім того, підвищений уміст сульфуру може спричиняти пролонговане підкислення середовища, що, своєю чергою, збільшує проникність цитоплазматичних мембран і клітинних оболонок [6, 22].

Виділення фенолоподібного ексудату також залежало від біологічних особливостей сортів мигдалю. Найбільшу кількість первинних експлантів із фенольним ексудатом зафіксовано у високорослого сорту Е5 Борозан, тоді як найменшу – у сорту Луїза, який характеризується середньою інтенсивністю росту.

Зважаючи на це, для подальших досліджень із отримання асептичної культури прямим морфогенезом було обрано поживне середовище NAM, а як донорський матеріал використовували рослини, попередньо вирощені в умовах депозитарію.

Крім того, інтенсивність виділення фенолоподібного ексудату залежала від типу деконтамінанта (рис. 3.1). Оскільки засоби для знищення контамінуючої мікробіоти мають різний рівень токсичності для тканин первинних експлантів, їх вплив виявлявся, зокрема, у вигляді поверхневих опіків рослинного матеріалу. На деяких уражених ділянках спостерігалися виділення фенолоподібного ексудату. Серед досліджуваних дезінфікуючих агентів найбільш інтенсивне виділення спостерігалось при застосуванні етанолу та гіпохлориту натрію, найменше – у разі використання РРМ та Бланідас 300 [12, 43]. Хлорид ртуті за цим показником займав проміжне положення [58].

У дослідженні оцінювався вплив різних деконтамінантів на рівень виділення фенолоподібного ексудату первинними експлантами чотирьох сортів мигдалю. Найвищий рівень ексудації спостерігався у сорту Е5 Борозан, де використання етанолу спричиняло максимальне виділення (10 %), тоді як гіпохлорит натрію та дихлорид ртуті викликали помірний ефект (6 % та 4 % відповідно). У сорту М41 Алекс рівень ексудації залишався низьким

незалежно від застосованого деконтамінанта [9], досягаючи максимуму 4% при використанні етанолу.

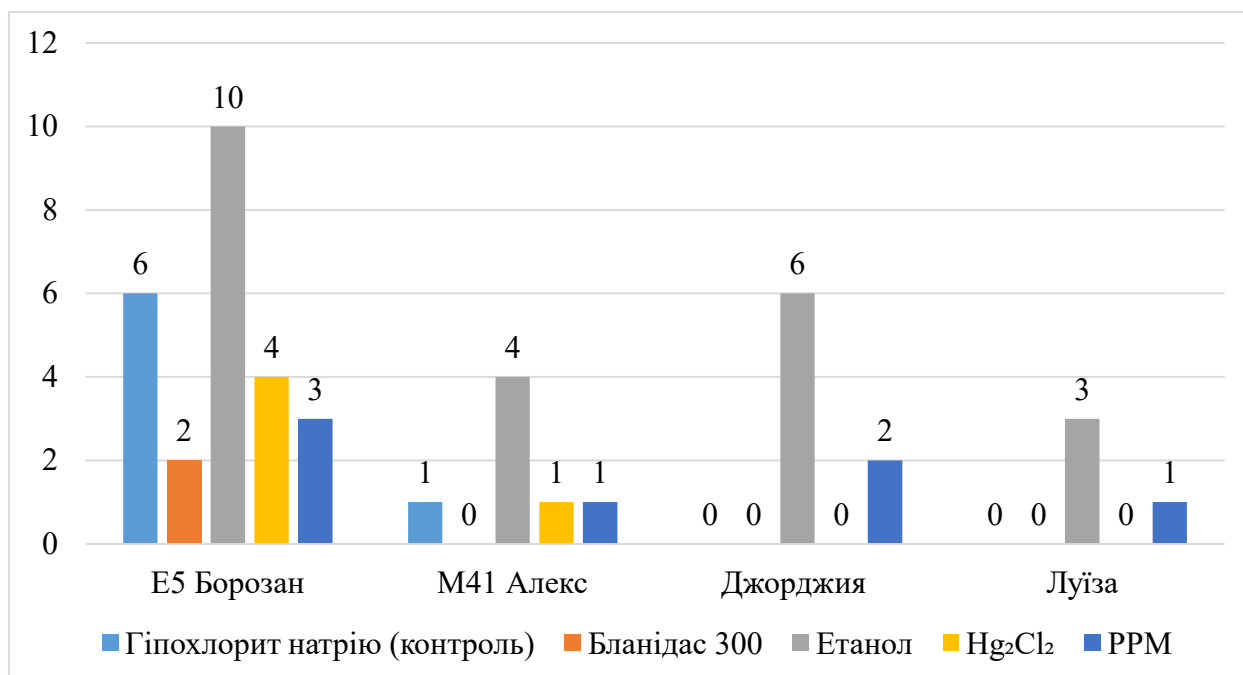


Рис. 3.1. Вплив деконтамінанта на виділення первинними експлантами фенолоподібного ексудату, %

Сорти Джорджия та Луїза демонстрували мінімальне виділення фенолоподібного ексудату, зокрема лише застосування етанолу призводило до його підвищення до 6 % та 3 % відповідно. Використання Бланідасу 300 та дихлориду ртуті виявилось менш ефективним у стимулюванні ексудації для всіх досліджуваних сортів, що може свідчити про їх слабкий вплив на процеси вивільнення фенолоподібних сполук. Отримані результати є важливими для оптимізації стерилізаційних процедур первинних експлантів та вибору ефективних деконтамінантів.

3.2 Ефективність деконтамінації

Деконтамінація – це процес усунення біологічних забруднень із поверхні експлантів, що можуть загрожувати рослинним об'єктам та поживному середовищу асептичної культури. Термін походить від латинських

слів *de* (префікс, що означає усунення) і *contaminatus* (забруднений, заражений) [6, 29, 51, 64, 122].

Біологічні контамінанти класифікують на екзогенні та ендогенні залежно від їхнього розташування на експлантах [22]. Відповідно, використовують різні методи очищення біологічного матеріалу. Для усунення екзогенних забруднень застосовують контактні антисептики з широким спектром дії, зокрема хлорвмісні та ртутьовмісні сполуки, рідше – перекис водню або спирт [19, 44]. Усунення ендогенного забруднення залежить від природи контамінуючої мікрофлори та передбачає використання біоцидів (наприклад, РРМ) [43], антибіотиків та/або фунгіцидів [43].

Потомство окремих експлантів формує лінії *in vitro*, які після перевірки на відсутність контамінантів аналізують та залучають до процесу мікроклонального розмноження [5, 9, 51, 64, 81].

Щоб вивести маточні рослини зі стану глибокого спокою, зрізані пагони протягом 24 годин витримували в розчині гіберелінів: 0,75 мг/л ГК₃ або у суміші ГК₄₊₇ (75 % ГК₄ і 18 % ГК₇) препарату *Gibb Plus* (Глобалхем Н.В.) в еквівалентній концентрації 0,75 мг/л [52, 53].

Ефективність деконтамінації (E_1) визначали як відсоток експлантів, що залишилися неінфікованими після стерилізації (c), відносно загальної кількості стерилізованих експлантів (s) за формулою 3.1:

$$E_1 = (c / s) \times 100 \% \quad (3.1)$$

Число морфогенних експлантів (E_m) визначали як відсоток деконтамінованих експлантів, у яких після стерилізації розпочався процес морфогенезу (m), від загальної кількості стерилізованих експлантів (s), за формулою 3.2:

$$E_m = (m / s) \times 100 \% \quad (3.2)$$

Як первинні експланти використовували пагони проростків із насіння [83], а також меристеми, бруньки та пагонові живці, отримані з сортових пагонів рослин.

Походження експлантів та підготовка їх донорів. Умови вирощування материнських донорних рослин визначають особливості морфогенезу та рівень контамінації первинних експлантів. У весняний період, під час природного пробудження, було здійснено порівняльний аналіз ефективності деконтамінації (E_1) та кількості морфогенних пагонових експлантів (E_m) мигдалю за використання антисептика гіпохлориту натрію. Дослідження охоплювало експланти, ізольовані з донорних рослин, вирощених у відкритому ґрунті (контроль) та в умовах депозитарію (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Вплив підготовки донорських рослин на ефективність деконтамінації (E_1) та частку морфогенних первинних експлантів (E_m) мигдалю, %

Сорт / умови вирощування маточних рослин	відкритий ґрунт		депозитарій	
	E_1	E_m	E_1	E_m
Е5 Борозан	68	51	91	73
М41 Алекс	70	49	87	70
Джорджия	56	32	77	64
Луїза	59	35	81	69

Підготовка донорських рослин первинних експлантів сприяла як підвищенню ефективності деконтамінації (E_1), так і збільшенню частки життєздатних та морфогенних експлантів. Залежно від сорту, в умовах депозитарію вдалося отримати 81–91 % зразків, вільних від контамінантів, тоді як у контрольних умовах цей показник становив 59–70 %. Частка морфогенних експлантів без ознак контамінації варіювалася від 69 % у сорту Луїза до 73 %, у сорту Е5 Борозан, що значно перевищувало контрольні значення (35 % і 51 %, відповідно).

Серед морфогенних експлантів, уражених контамінуючою мікрофлорою, домінувало ендогенне забруднення [42]. На місцях зрізу пагонової частини живців спостерігалось утворення білого мутного ексудату. Для підтвердження його мікробіологічного походження, а не належності до продуктів метаболізму рослинних тканин, частину виділень перенесли на свіже

стерильне середовище. На 3–5 день на ньому зафіксували ріст мікроорганізмів, що свідчило про наявність бактеріального контамінування.

Отже, у подальших дослідженнях донорів експлантів вирощували виключно в депозитарії.

Показники E_1 та E_m використовували для порівняння різних типів експлантів: живців (фрагментів зеленого пагона), бруньок, пагонів проростків та меристем (табл. 3.4). Серед цих варіантів найвищу ефективність деконтамінації (понад 90 %) продемонстрували експланти, отримані з пагонів проростків ядра та меристем. Однак застосування проростків може призводити до втрати генетичної стабільності сорту.

Водночас, використання меристем поступалося іншим варіантам за кількістю морфогенних експлантів: цей показник становив від 8 % до 17 % порівняно з 81–91 % у контролі (пагонові живці). Проте застосування меристем як первинного матеріалу може бути необхідним і єдиним можливим варіантом у випадках, коли діагностика материнських донорних рослин *in vivo* виявляє наявність патогенних мікроорганізмів, таких як віроїди, віруси, бактерії тощо.

Таблиця 3.4

Ефективність деконтамінації (E_1) та відсоток морфогенних експлантів (E_m) мигдалю залежно від типу експланта

Сорт / тип експланта	пагоновий живець (контроль)		брунька		пагін проростка		меристема	
	E_1	E_m	E_1	E_m	E_1	E_m	E_1	E_m
Е5 Борозан	91	73	94	69	97	79	98	17
М41 Алекс	87	70	91	54	93	77	95	11
Джорджия	77	64	83	51	90	83	96	8
Луїза	81	69	86	47	92	80	91	8

Якщо збудники не були виявлені, серед порівнюваних варіантів первинних експлантів для прямого морфогенезу найбільш оптимальними є бруньки. Вони продемонстрували вищу ефективність деконтамінації

порівняно з контролем, хоча й поступалися йому за кількістю морфогенних експлантів.

Зниження кількості морфогенних експлантів, особливо у бруньках і меристемах, обумовлене закономірністю: чим менший розмір експланту, тим нижчий відсоток морфогенних зразків. Водночас менші за розмірами експланти містять менше як контамінантів, так і патогенних мікроорганізмів.

Для подальших досліджень було обрано варіант первинних експлантів «брунька».

Результати також засвідчили вплив строку ізоляції первинних експлантів. (табл. 3.5). Взаємодія рослини з мікробіотою змінюється залежно від пори року, що впливає на рівень контамінування первинних експлантів. Це, своєю чергою, позначається на ефективності деконтамінації (E_1) та ймовірності мікробіологічного забруднення живильного середовища.

Таблиця 3.5

Вплив сезону введення в культуру первинних експлантів на ефективність їх деконтамінації (E_1) та відсоток морфогенних експлантів (E_m) мигдалю, залежно від типу експланта

Сорт / тип експланта	весна (контроль)		друга хвиля росту		штучне пробудження		глибокий спокій	
	E_1	E_m	E_1	E_m	E_1	E_m	E_1	E_m
Е5 Борозан	93	70	78	57	11	8	4	-
М41 Алекс	91	56	74	41	13	6	7	-
Джорджия	83	51	65	40	8	9	3	-
Луїза	84	47	63	42	6	4	9	-

Найвищі показники ефективності деконтамінації (83–93 %) та морфогенності первинних експлантів (E_m) спостерігали у варіанті, де бруньки ізолювали навесні під час природного пробудження материнських рослин у депозитарії. Дещо нижчі результати спостерігалися при виокремленні бруньок у літній період у період другого етапу росту.

Ймовірно, навіть за умов відносної ізоляції в депозитарії відбувалося поступове збільшення кількості мікробіоти, а також зміна інших факторів, що

впливали як на рівень контамінації, так і на метаболічні особливості донорських рослин брунькових експлантів [42].

Варіант зі штучним виведенням донорів зі стану спокою значно поступався контрольному за обома показниками. Під час ізоляції експлантів у стані спокою ефективність деконтамінації (E_1) залежно від сорту становила лише 3–9 %, тоді як у контрольному варіанті цей показник досягав 83–93 %. Морфогенних експлантів у всіх чотирьох сортах виявлено не було.

Для усунення екзогенного забруднення було протестовано такі деконтамінанти: гіпохлорит натрію, етанол, хлорид ртуті, Бланідас 300 та PPM (табл. 3.6). Найвищі показники ефективності деконтамінації (E_1) та рівня морфогенності експлантів (E_m) спостерігалися у контрольному варіанті (гіпохлорит натрію) та при застосуванні Бланідас 300. У останньому випадку кількість морфогенних експлантів становила 63–78 % порівняно з 47–69 % у контролі.

Найменшу ефективність очищення та морфогенезу продемонстрував етанол, оскільки його сильний опіковий ефект негативно впливав на тканини первинних експлантів, знижуючи здатність до усунення контамінуючої мікрофлори.

Таблиця 3.6

Вплив деконтамінанта на ефективність видалення контамінантів (E_1) та кількість морфогенних експлантів (E_m) мигдалю, %

Сорт / деконтамінант	Гіпохлорит натрію (контроль)		Бланідас 300		Етанол		Hg ₂ Cl ₂		PPM	
	E_1	E_m	E_1	E_m	E_1	E_m	E_1	E_m	E_1	E_m
Е5 Борозан	91	69	93	78	16	4	76	57	79	65
М41 Алекс	92	57	93	77	11	2	77	53	77	64
Джорджия	84	51	90	63	7	3	61	56	81	63
Луїза	82	47	88	65	8	1	75	51	76	51

У варіантах із хлоридом ртуті та PPM ефективність деконтамінації (E_1) досягала 61–79 %, а рівень морфогенності експлантів (E_m) – 51–65 %. Попри

задовільні результати, ці речовини не були обрані як основні деконтамінанти: хлорид ртуті є небезпечним для здоров'я людини та довкілля, а РРМ, крім високої вартості, потребує значних витрат препарату (розчини 35–50 %).

Контрольний варіант також був відхилений через нестабільність сполуки, що ускладнює підбір оптимальної концентрації. У подальших дослідженнях пріоритетним засобом деконтамінації залишався Бланідас 300.

У первинних експлантах можуть міститися як екзогенні, так і ендогенні мікроорганізми, які, хоча й не завдають значної шкоди рослинним клітинам, при потраплянні на штучне живильне середовище роблять його непридатним для використання, зокрема через підвищення токсичності [19, 22, 44].

Основна складність боротьби з ендогенною контамінуючою мікрофлорою полягає в її великому видовому різноманітті, що охоплює представників різних родин і царств, а також у вибірковій дії засобів, які застосовуються для боротьби з цими організмами. Наприклад, хлорамфенікол, який ефективно знищує бактерії на хості, виявився малоефективним для деконтамінації первинних експлантів агапантусу [8, 22].

Було проведено дослідження ефективності додаткових деконтамінантів на фоні основного засобу Бланідас 300 (табл. 3.7). Системний фунгіцид Превікур Енерджі 840 SL, в.р.к. застосовували для замочування первинних експлантів перед основним обробком, тоді як інші речовини, зокрема гентаміцину сульфат (160 мг/л), хлорамфенікол (250 мг/л), стрептоміцин (125 мг/л), РРМ (2,5 мл/л) та нітрат срібла (3 мг/л), додавали безпосередньо до живильного середовища.

Застосування стрептоміцину як єдиного антибіотика суттєво підвищило ефективність деконтамінації (E_1): у контрольному варіанті вона становила 87 % для сорту Луїза та 93 % для сорту М41 Алекс, тоді як за використання стрептоміцину цей показник зріс до 95 % і 98 %, відповідно. Водночас відбулося зниження кількості морфогенних експлантів – з 64–77 % у контролі до 54–63 % у варіанті зі стрептоміцином.

Таблиця 3.7

**Вплив додаткового деконтамінанта на ефективність очищення від
контамінантів (E_1) та частку морфогенних експлантів (E_m) мигдалю, %**

Деконтамі- нант	К		ПЕ		ГС		Хф		Ст		PPM		AgNO ₃	
Показник/сорт	E_1	E_m	E_1	E_m	E_1	E_m	E_1	E_m	E_1	E_m	E_1	E_m	E_1	E_m
Е5 Борозан	91	77	95	89	93	26	90	15	96	63	95	72	92	49
М41 Алекс	93	77	92	84	92	29	93	13	98	61	98	76	90	44
Джорджия	91	64	92	84	89	21	90	11	96	54	94	69	92	43
Луїза	87	67	90	87	91	18	86	12	95	58	91	68	90	48

* Примітка: Скорочення: К – контроль, PPM – Plant Preservative Mixture, ГС – гентаміцину сульфат, ПЕ – Превікур Енерджі 840 SL, в.р.к., Хф – хлорамфенікол, Ст – стрептоміцин, AgNO₃ – нітрат срібла.

На всіх варіантах із антибіотиками рівень морфогенності експлантів (E_m) суттєво знижувався, водночас найвиразніше пригнічення спостерігалось при застосуванні хлорамфеніколу, що, ймовірно, зумовлено його впливом на конкурентне інгібування ферментів та пригнічення синтезу білків [29, 140].

Біоцид PPM продемонстрував показники морфогенності експлантів (E_m), близькі до контрольних: 68–72 % проти 64–77 % у контролі. Фунгіцид Превікур Енерджі 840 SL, в.р.к., хоча й незначно вплинув на E_1 (90–95 % проти 87–91 % у контролі), суттєво підвищив морфогенність експлантів: залежно від сорту цей показник становив 84–89 % порівняно з 64–77 % у контрольному варіанті.

3.3. Дедиференціація та диференціація первинних експлантів

Мікроклональне розмноження, культура меристем для оздоровлення, а також процеси диференціації та дедиференціації відіграють важливу роль як у сучасному розсадництві, так і в селекційній роботі, зокрема за вирощування мигдалю [76, 79, 80, 87, 90, 92, 93, 102, 104, 105]. Калусні культури є перспективним напрямом, оскільки вони зручні для маніпуляцій, таких як трансгенез, соматична гібридизація та глибока дедиференціація *in vitro*. Це особливо важливо для ботанічних видів, у яких прямий морфогенез у

первинних експлантів на початкових етапах мікроклонального розмноження є ускладненим. Передбачається, що глибока дедиференціація в калусній культурі відіграє ключову роль у дерепресуванні ювенільних генів [64].

У процесі введення експлантів в асептичні умови було зафіксовано спонтанне калусоутворення, проте з ознаками вітрифікації [27, 31]. Це явище спостерігалось на живильному середовищі Мурасіге та Скуга (MS) (рис. 3.2). Калуси утворювалися у 5–8 % первинних експлантів за наявності в середовищі цитокініну БАП (1,0 мг/л) та ауксину індолілмасляної кислоти (1,0 мг/л). При багаторазових пасажах (три і більше) кількість калусних експлантів зростала, однак отримані калуси мали щільну структуру, не виявляли морфогенних властивостей і поступово змінювали колір від яскраво-зеленого до коричневого, що згодом призводило до їх відмирання (рис. 3.3).



Рис. 3.2. Спонтанне формування калусу та вітрифікація первинних експлантів мигдалю сорту Луїза на живильному середовищі MS



Рис. 3.3. Щільні калуси з обмеженою морфогенною активністю

Середовище MS, порівняно з іншими середовищами (QL, DKW, NAM, NRM), містить підвищену концентрацію мінеральних елементів, особливо солей нітрогену, що могло впливати на формування калусних структур.

Оскільки середовище MS, ймовірно, через високий вміст мінеральних та органічних компонентів (4405,19 мг/л за [79, 80]) спричиняло фітотоксичний

ефект (прояви вітрифікації, фенолоутворення, розеточність), подальші експерименти проводили на середовищі NAM [129, 132].

Частка первинних експлантів із ознаками калусоутворення зростала зі збільшенням рівня як окремих цитокінінів та ауксинів, так і їхніх комбінацій (табл. 3.8). Підвищення концентрації бензиламінопурина (БАП) до 5,0 мг/л або індолілмасляної кислоти (ІМК) до 5,0 мг/л, а також їхнє поєднання (БАП 5,0 мг/л + ІМК 5,0 мг/л) позитивно впливали на калусогенез як у кількісному, так і в якісному аспектах.

У варіанті з БАП 5,0 мг/л та ІМК 1,0 мг/л загальна кількість експлантів із калусами ($\Sigma_{\text{всього}}$) у різних сортах становила 24–39 %, із яких морфогенними були 7–12 %. Збільшення концентрації ІМК до 5,0 мг/л за тієї ж кількості БАП сприяло загальному зростанню кількості калусних експлантів, однак частка морфогенних структур знизилася до 4–11 %. При високій концентрації ІМК та 1,0 мг/л БАП загальний показник ($\Sigma_{\text{всього}}$) складав 22–27 %, тоді як частка морфогенних калусів зменшувалася до 1–5 %.

Таблиця 3.8

Вплив різних концентрацій бензиламінопурина та індолілоцтової кислоти на калусогенез у первинних експлантах на живильному середовищі NAM, %

Сорт	Живильне середовище/ концентрація							
	БАП 1,0/ІМК 1,0		БАП 5,0 ІМК 1,0		БАП 1,0 ІМК 5,0		БАП 5,0 ІМК 5,0	
	* $\Sigma_{\text{всього}}$	$\Sigma_{\text{морф}}$	$\Sigma_{\text{всього}}$	$\Sigma_{\text{морф}}$	$\Sigma_{\text{всього}}$	$\Sigma_{\text{морф}}$	$\Sigma_{\text{всього}}$	$\Sigma_{\text{морф}}$
Е5 Борозан	0	0	27	11	23	3	49	9
М41 Алекс	0	0	24	7	22	3	63	5
Джорджия	0	0	31	9	24	1	66	4
Луїза	1	0	39	12	27	5	71	11

Примітка: Скорочення: $\Sigma_{\text{всього}}$ та $\Sigma_{\text{морф}}$ – кількість калусів всього та морфогенних у відсотках.

Для підвищення кількості морфогенних калусів було обрано сполуки з цитокініновою активністю (табл. 3.9) на тлі ауксину ІМК у концентрації 1,0 мг/л.

Застосування кінетину у дозі 5,0 мг/л порівняно з БАП за тієї ж концентрації, сприяло вищому відсотку первинних експлантів, що формували калус (41–46 % проти 23–38 %). Крім того, кількість морфогенних калусів у варіанті з кінетином була більшою (33–41 %) порівняно з БАП (7–13 % за 5,0 мг/л).

Отримані результати свідчать про можливий фітотоксичний ефект зазначеної концентрації [46, 61, 68,].

Відмінності у впливі синтетичних аналогів гормонів одного класу на морфогенез зумовлені багатовекторною дією природних цитокінінів, які можуть існувати та функціонувати в різних формах.

Таблиця 3.9

Вплив концентрацій речовин з цитокініноюю активністю на процес калусогенезу у первинних експлантатах на живильному середовищі NAM, %

Сорт / кількість речовини, мг/л	БАП 5,0		БАП 1,0 К 4,0		К 5,0		БАП 1,0 + К 2,0 АС 2,0	
	* $\Sigma_{\text{всього}}$	$\Sigma_{\text{морф}}$	$\Sigma_{\text{всього}}$	$\Sigma_{\text{морф}}$	$\Sigma_{\text{всього}}$	$\Sigma_{\text{морф}}$	$\Sigma_{\text{всього}}$	$\Sigma_{\text{морф}}$
Е5 Борозан	26	13	51	29	44	33	38	36
М41 Алекс	23	7	44	33	41	37	31	28
Джорджия	33	10	49	21	46	36	33	30
Луїза	38	12	69	27	48	41	41	38

Примітка: скорочення: $\Sigma_{\text{всього}}$ та $\Sigma_{\text{морф}}$ відповідає кількість калусів всього та морфогенних калусів у відсотках; К – кінетин; АС – аденін сульфат.

Найбільшу загальну кількість експлантів із калусами зафіксовано у варіанті з поєднанням БАП (1,0 мг/л) та кінетину (4,0 мг/л), що становила 49–69 %. Проте цей варіант поступався за рівнем морфогенних калусів, кількість яких становила 21–33 %.

Дещо нижчий загальний рівень калусоутворення спостерігався при використанні комбінації трьох речовин – 31–41 % та 28–38 %. Таким чином, загальна кількість калусів у цьому варіанті була середньою для досліджу, але спостерігався серед них найвищий відсоток морфогенних. Відмінність цих

калусів (рис. 3.4) полягала у світлішому забарвленні та більш пухкій структурі порівняно з іншими варіантами.



Рис. 3.4. Розрихлені калуси на середовищі з БАП (1,0 мг/л) + К (2,0 мг/л) + АС (2,0 мг/л)

Примітка: скорочення: БАП – бензиламінопурин; К – кінетин; АС – аденін сульфат.

Висока морфогенна активність цієї комбінації, ймовірно, зумовлена наявністю різних форм біологічно активних речовин, що є аналогами природного цитокініну. До того ж, аденін виступає вихідною сполукою для синтезу природного фітогормону (рис. 3.5). У такому випадку рослинний організм самостійно регулює рівень необхідного гормону, запобігаючи його накопиченню до фітотоксичних концентрацій [29, 122].

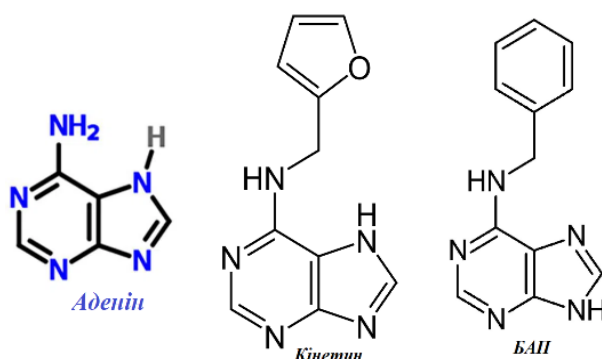


Рис. 3.5. Структурна подібність і цитокінінова активність аденіну, кінетину та БАП

Для підвищення ефективності морфогенезу калусних культур дедиференційовану клітинну масу відокремлювали від первинних експлантів і культивували на середовищі з додаванням БАП (1,0 мг/л), кінетину (2,0 мг/л) та аденінсульфату (2,0 мг/л). Після досягнення необхідної кількості калусів їх переносили на середовище, що містило кінетин (1,0 мг/л), аденінсульфат (1,0 мг/л), індолілмасляну кислоту (0,1 мг/л) та гіберелін у різних концентраціях (табл. 3.10).

Таблиця 3.10

**Вплив різних концентрацій гібереліну на морфогенез калусів
мигдалю, %**

Сорт	контроль		ГК 0,5 мг/л		ГК 1,0 мг/л		ГК 1,5 мг/л		ГК 2,0 мг/л	
	Σ_1	Σ_2	Σ_1	Σ_2	Σ_1	Σ_2	Σ_1	Σ_2	Σ_1	Σ_2
Е5 Борозан	35	11	38	41	78	82	79	78	74	12
М41 Алекс	29	25	30	42	73	85	84	82	36	16
Джорджия	30	14	28	45	75	89	74	79	39	13
Луїза	39	19	37	41	81	94	78	86	48	18

Примітка. Скорочення: Σ_1 та Σ_2 відповідає кількість морфогенних калусів перший пасаж та другий пасаж у відсотках; ГК – гіберелова кислота.

Рівень гібереліну у формі гіберелової кислоти (ГК₃) впливав на морфогенність як у першому, так і в другому пасажах. Послідовність процесу непрямого морфогенезу первинних експлантів представлена на (рис. 3.6.)

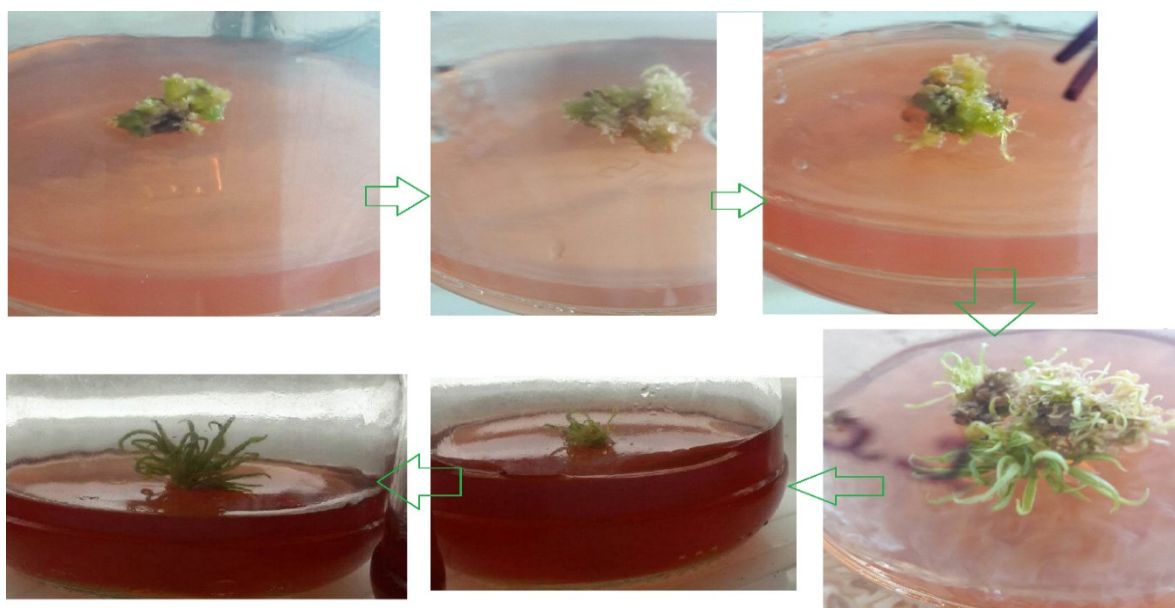


Рис. 3.6. Процес морфогенезу калусних структур мигдалю

Порівняно з контролем без гібереліну, додавання ГК₃ у концентраціях 1,0 мг/л, 1,5 мг/л і 2,0 мг/л на першому пасажі сприяло збільшенню кількості калусів, у яких розпочався процес органоутворення (візуально спостерігалось формування розеток із листкових пластинок), підвищуючи цей показник з 29–39 % до 73–84 %.

Водночас внесення ГК₃ у концентрації 0,5 мг/л не спричинило значущого впливу на морфогенез порівняно з контролем.

Висновки до розділу 3

У результаті проведених досліджень визначено оптимальні умови для ефективної деконтамінації первинних експлантів мигдалю та стимуляції морфогенезу *in vitro*.

1. Найбільшу ефективність очищення від контамінантів (E_1) забезпечило вирощування донорних рослин у депозитарних умовах, де рівень асептичності експлантів досягав 81–91 %, що значно перевищувало показники відкритого ґрунту (59–70 %).

Серед досліджених деконтамінантів найвищу ефективність продемонстрував Бланідас 300, забезпечивши рівень деконтамінації 88–93 % та максимальну кількість морфогенних експлантів (63–78 %).

2. Найвищу ефективність стерилізації та морфогенезу продемонстрували бруньки, ізольовані навесні в період природного відновлення активності ($E_1 = 83–93$ %; $E_m = 47–70$ %).

Введення експлантів у культуру під час глибокого спокою призводило до значного зниження рівня деконтамінації (3–9 %) та відсутності морфогенезу.

3. Найвища ефективність деконтамінації (94–98 %) встановлена у варіантах із використанням меристем та пагонів проростків. Проте через втрату генетичної стабільності проростки не були рекомендовані для подальших досліджень.

Оптимальним варіантом експлантів для прямого морфогенезу визначено бруньки, які мали високу ефективність деконтамінації (86–94 %) та достатню морфогенну активність (47–69 %).

4. Встановлено, що середовище MS сприяє спонтанному калусоутворенню, проте калуси мали низьку морфогенну активність та піддавалися вітрифікації.

Найбільш сприятливим середовищем для індукції калусів визнано NAM із додаванням БАП (1,0–5,0 мг/л) та ІМК (1,0–5,0 мг/л).

Найкращі результати отримані при комбінації БАП 1,0 мг/л + кінетин 2,0 мг/л + аденінсульфат 2,0 мг/л, що забезпечувало утворення морфогенних калусів у 28–38 % експлантів.

Додавання гіберелової кислоти (ГК₃) у концентрації 1,0–2,0 мг/л значно підвищувало рівень морфогенезу у калусних культурах (73–94 %).

Отже, результати дослідження дали змогу розробити ефективну методику отримання асептичної культури мигдалю *in vitro* та вдосконалити процес непрямого морфогенезу. Отримані результати є цінними для подальшої розробки методів мікроклонального розмноження мигдалю.

За матеріалами досліджень розділу 3 опубліковано 2 наукові праці [64, 62].

РОЗДІЛ 4

ОСОБЛИВОСТІ ПРОВЕДЕННЯ ЖИВЦЮВАННЯ ТА МУЛЬТИПЛІКАЦІЇ МИГДАЛЮ

4.1. Особливості загальної стратегії живцювання мигдалю *in vitro*

Мигдаль належить до роду *Prunus* (Слива), підродини мигдалевих (*Amygdaloideae*) або сливових (*Prunoideae*) родини Розових (*Rosaceae*). За ботанічною класифікацією він належить до кісточкових культур, проте з господарської точки зору вважається горіхоплідною культурою, оскільки його ядро кістянки використовується подібно до ботанічних горіхів, таких як фундук і волоський горіх.

Для збереження господарсько цінних ознак, створених у процесі селекції, мигдаль розмножують вегетативними методами. Найбільш сучасним і ефективним серед них є метод культивування тканин [110, 116, 126, 127, 128, 135, 144, 150, 153], який дозволяє регенерувати укорочений мікропагін-розетку з меристеми (рис. 4.1).



Рис. 4.1. Етапи регенерації прямим морфогенезом меристемного експланта:

- 1) меристема на кінчику скальпеля;
- 2) формування примордіального листка;
- 3–4) поява листків;
- 5–7) подальше розростання ущільненої розетки.

Біотехнологічні аспекти вирощування рослин визначаються біологічними особливостями конкретного ботанічного виду чи сорту [24, 162]. У випадку мікроклонального розмноження (МКР) мигдаль класифікується як

кісточкова культура, для якої характерні спільні риси розмноження *in vitro* [5, 6, 24, 106, 107, 116, 127, 134, 136, 153, 144]:

- помірна потреба в кальції;
- схильність до гіпергідратації тканин за підвищеного вмісту іонів амонію та гідрогену;
- труднощі, типові для деревних культур, зокрема самоінтоксикація внаслідок окиснення фенольних сполук;
- нерівномірність росту.

Відмінності у рості та морфогенезі живцевих експлантів зумовлені специфікою формування вегетативних і генеративних бруньок у кісточкових культур (рис. 4.2), а також періодичністю їхнього росту (рис. 4.3).

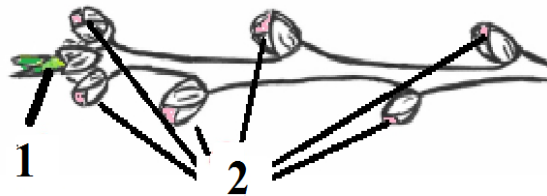


Рис. 4.2. Закладання вегетативних (1) та генеративних бруньок (2) на пагоні мигдалю

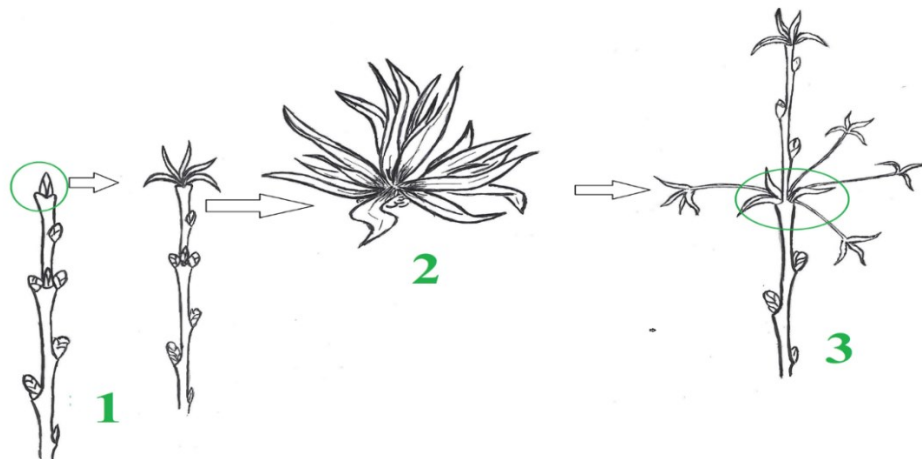


Рис. 4.3. Особливості періодичності формування пагонів із вегетативної бруньки, де: 1 – гілка, що утворюється під час першої хвилі росту; 2 – формування розетки та вегетативної бруньки; 3 – поява пагонів у другій хвилі росту.

Морфогенетичну активність демонструють вегетативні бруньки пагонів. У мікроклональному розмноженні мигдалю поділ пагона на одно- або двовузлові живці є малоефективним з технологічної точки зору. Тому розмноження здійснюють шляхом стимулювання утворення розетки пагонів із верхівкової бруньки (рис. 4.4).

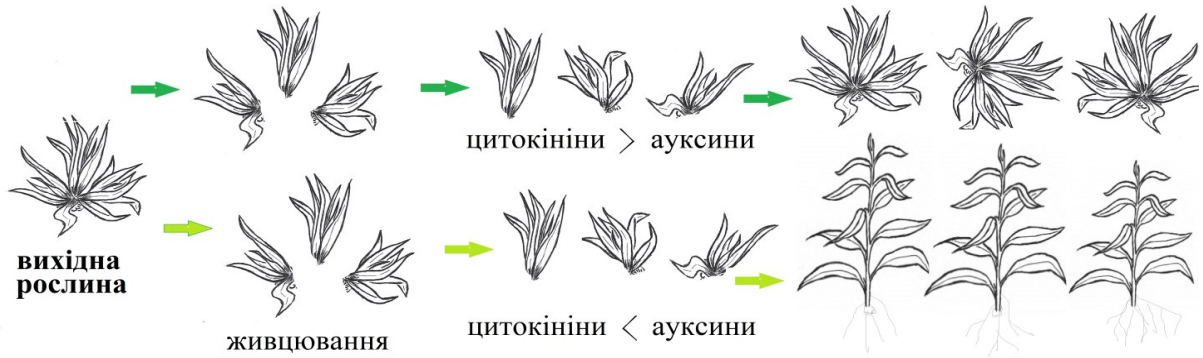


Рис. 4.4. Гормональна детермінація при мікроклональному розмноженні (МКР) мигдалю згідно з правилом Скуга-Міллера

Методика мікроклонального розмноження (МКР) мигдалю ґрунтується на стимулюванні утворення розетки пагонів із верхівкової бруньки. Оскільки морфогенний потенціал мають лише вегетативні бруньки пагона, поділ його на одно- або двовузлові живці вважається малоефективним з технологічної точки зору.

4.2. Особливості трофічної, фітогормональної детермінації *Prunus dulcis* онтогенезу *in vitro*

В частині досліджень, що стосувалися мультиплікації, додавали гормони БАП 1,5 мг/л ІМК 0,3 мг/л. На третьому етапі мікроклонального розмноження (МКР) для індукції ризогенезу додавали БАП у концентрації 0,3 мг/л та ІМК – 1,5 мг/л.

На першому етапі МКР поряд з деконтамінацією є проблематичним адаптація метаболізму та зміна гормонального статусу відповідно до нових умов існування. Зокрема, змінюється тип живлення із автотрофного на міксотрофний з домінуванням гетеротрофного. Додавання екзогенних аналогів гормонів сумісно з іншими факторами, наприклад, зміна

кореляційних зв'язків є передумовою зміни активності синтезу та дії ендогенних гормонів.

У випадку ізоляції первинних експлантів з рослин донорів окрім порушення взаємозв'язків, які були в системі регулювання цілісного організму, відбувається утворення раневих поверхонь. У якості захисної реакції відбувається окиснення фенолоподібних речовин до хінонів на зрізах, в поверхневих тканинах, точках росту. В природі ці речовини захищають від пошкодження шкідниками, окиснювального стресу, а в закритих ємкостях і малому об'ємі повітря, живильного середовища в неадаптованих первинних експлантів відбувається самоотруєння [54, 122].

Материнські рослини донори експлантів готували в умовах із штучним розсіяним освітленням без УФ-випромінювання, та з декапітацією верхівок. Оскільки за таких умов менш накопичується фенолів [125]. Як контроль використовували донорів вирощених в польових умовах. За первинного культивування встановили вплив умов вирощування рослин *in situ* та трофічних детермінант різних за мінеральною частиною модифікованих штучних живильних середовищ (табл. 4.1).

Таблиця 4.1

Самоінтоксикація первинних експлантів залежно від складу середовища та умов культивування донорних рослин, %

Сорт / середовище	MS _{мод.}	QL _{мод.}	DKW _{мод.}	NAM _{мод.}	NRM _{мод.}
Е5 Борозан	23/12	6/2	21/18	6/1	8/3
М41 Алекс	19/12	5/2	12/9	0/0	7/2
Джорджия	14/10	3/1	11/9	0/0	4/0
Луїза	8/6	-	6/5	0/0	1/0

Примітка: в чисельнику самоінтоксикація експлантів ізольованих з материнських рослин вирощених в польових умовах (контроль); в знаменнику – в умовах депозитарію.

Дослідженнями встановлено вплив біологічних особливостей первинних експлантів, а саме – ботанічного виду та сорту на отруєння продуктами окиснення фенолоподібних речовин. Було зафіксовано значні втрати експлантів мигдалю внаслідок цього процесу. Переважало окиснення

фенолоподібних речовин в базальній частині експлантату і частина таких експлантів завдяки проліферації бруньок виживало.

В мигдалю найбільше експлантів з фенольними виділеннями відмічено у сорту Е5 Борозан і найменше в сорту Луїза. Фенолоутворення, а також ефективність боротьби з цим явищем залежали від ботанічного виду та заходів підготовки материнських рослин. У мигдалю частка експлантів з ознаками фенольного потемніння коливалася в межах 8–23 % до 6–12 %, тобто, менше як в два рази.

Первинні експланти мигдалю було висаджено на середовища із сахарозою. Встановлено, що на таких середовищах кількість експлантів із самоінтоксикацією була на 3–5 % вищою порівняно з середовищами із глюкозою. Склад середовищ також впливав на появу токсичних сполук. У всіх досліджуваних сортів мигдалю найбільше фенолоподібних речовин виділялося на середовищі MS_{мод.} Найменша активність утворення токсинів у рослин була на середовищі NAM_{мод.}

Живильні середовища за умістом мінеральних елементів різнилися між собою, що мало трофічний детермінуючий вплив на онтогенез регенерантів, зокрема і на біометричні показники (табл. 4.2).

Таблиця 4.2

Підбір живильних середовищ та їх вплив на висоту регенерантів на 90 день культивування *in vitro*, мм

Сорти	MS _{мод.}	QL _{мод.}	DKW _{мод.}	NAM _{мод.}	NRM _{мод.}
Е5 Борозан	84/21	93/73	39/12	123/98	97/69
М41 Алекс	78/18	84/71	37/13	134/94	96/66
Джорджия	71/13	69/63	33/15	103/84	81/61
Луїза	45/12	67/64	23/12	101/85	77/63

Примітка: в чисельнику висота регенерантів (в мм) за першого культивування; в знаменнику висота регенерантів за п'ятого пасажу.

Для регенерантів мигдалю усіх чотирьох сортів кращим було середовище NAM_{мод.} Технологічно неприйнятними для цього виду рослин були середовища MS_{мод.} та DKW_{мод.}

В процесі тривалого вегетативного розмноження, яким є пасажування *in vitro*, постійно на одному варіанті середовищ відбувається накопичення негативного впливу нестачі одних і/або надлишку інших елементів живлення [3, 61, 62, 63]. Живцювання методом накладання в умовах нашого дослідження зумовлювало зменшення біометричних параметрів регенерантів за той самий період росту (90 днів).

Для вирішення цієї проблеми випробувано застосування через п'ять культивувань на основному середовищі одного культивування на шостому пасажі іншого середовища, яке відрізнялося за складом мінеральних елементів (табл. 4.3) з умовною назвою «розвантажувальне» (P_{cm}). Для мигдалю основним є – $NAM_{mod.}$, а в якості розвантажувального – середовище $QL_{mod.}$.

Застосування комбінацій $QL_{mod.}$ та $NAM_{mod.}$ було неефективним для підтримання сталого регенераційного потенціалу під час пасажувань від першого до десятого включно пасажу для сортів мигдалю, залучених в дослідження. Пересадка на інше середовище (шостий, сьомий пасаж) давала збільшення висоти. Однак в наступних пасажах відбулося зменшення цього показника в регенерантів. На середовищі $QL_{mod.}$ для більшості рослин була притаманна розеточність, тобто, вкорочення пагона.

Таблиця 4.3

**Вплив живильних середовищ та їх повторюваність на висоту
регенерантів на 90 день культивування *in vitro*, мм**

Сорт/середовище	$QL_{mod.}$	P_{cm}	$QL_{mod.}$	$NAM_{mod.}$	P_{cm}	NAM_{mo} д.
Пасаж	5	6	7/10	5	6	7/10
Е5 Борозан	73	106	109/65	98	112	114/95
М41 Алекс	71	102	106/54	94	116	109/81
Джорджия	63	91	98/57	84	94	103/69
Луїза	64	97	101/50	85	90	94/69

Примітка: скороченню P_{cm} відповідає «розвантажувальне середовище», яке відрізнялося за складом мінеральних елементів.

Для розвантаження використовували NAM -модифікацію середовища для мигдалю зі зміненням вмістом цитокінінів та ауксинів. Суть цієї комбінації

полягала в тому, що шостий пасаж проводили на середовищі з іншим гормональним балансом (табл. 4.4).

Наприклад, на етапі мультиплікації основним було середовище зі співвідношенням цитокінінів і ауксинів: БАП – 1,5 мг/л, ІМК – 0,3 мг/л. Водночас у розвантажувальному середовищі цей баланс змінювали на БАП – 0,3 мг/л, ІМК – 1,5 мг/л, тобто, цитокінін-ауксиновий індекс змінювався з 1,5/0,3 на 0,3/1,5.

При індукції ризогенезу відбувалася зворотна зміна – зі співвідношенням 0,3/1,5 на 1,5/0,3.

Таблиця 4.4

Вплив цитокінінін ауксинового індексу при різному підборі пасажу на висоту регенерантів на 90 день культивування *in vitro*, мм

Сорт	Мультиплікація			Індукція ризогенезу		
ц.а. індекс*	1,5/0,3	0,3/1,5	1,5/0,3	0,3/1,5	1,5/0,3	0,3/1,5
пасаж	5	6	7/10	5	6	7/10
Е5 Борозан	98	103	100/91	102	107	103/104
М41 Алекс	94	100	97/89	108	112	107/101
Джорджия	84	91	89/83	94	99	97/91
Луїза	85	93	86/74	96	97	98/90

Примітка: ц.а. індекс – цитокінінін ауксиновий індекс, тобто співвідношення цитокінінів (БАП) і ауксинів (ІМК).

У культурі мигдалю регенеранти мали більшу висоту за переважання ауксинів над цитокінінами (0,3/1,5). Однак в рослин, як правило, формувався один пагін. Проте тривале культивування за такого переважання ауксинів призводить до зменшення регенераційного потенціалу, зменшення висоти регенерантів, коефіцієнта розмноження (рис. 4.5). Вважаємо, що протягом вегетативного розмноження пасажуванням відбувається накопичення надлишку як екзогенних, так і ендогенних фітогормонів, зокрема, ауксинів та цитокінінів [33, 42, 60, 107, 139].

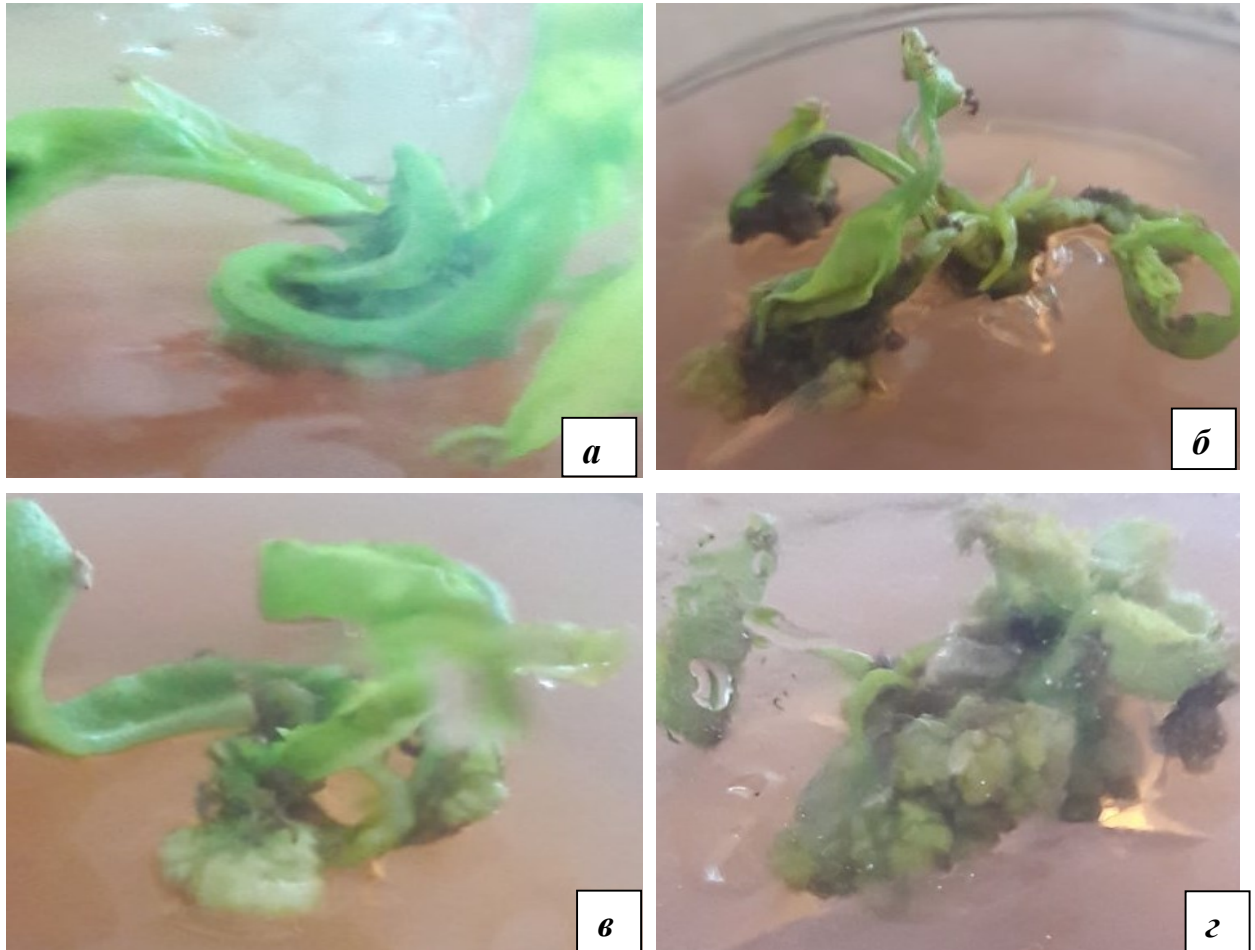


Рис. 4.5. Калусоутворення *in vitro* в експлантів мигдалю за додавання в живильне середовище одночасно у високих концентраціях цитокініну БАП та ауксину індолілоцтової кислоти: а – розеточне стебло регенерантів мигдалю сорту М41 Алекс на середовищі з додаванням 1,0 мг/л БАП та 1,0 мг/л ІМК; б – розеточне стебло та калусоутворення регенерантів мигдалю сорту М41 Алекс на середовищі з додаванням 1,5 мг/л бензиламідопіріну та 1,5 мг/л ІМК; в – калусоутворення регенерантів мигдалю сорту М41 Алекс в базальній частині живцевого експланта на середовищі з додаванням 2,0 мг/л бензиламідопіріну та 2,0 мг/л ІМК; г – калусоутворення мигдалю сорту М41 Алекс по усій поверхні живцевого експланта на середовищі з додаванням 2,5 мг/л бензиламідопіріну та 2,5 мг/л ІМК

Застосування середовища зі зміненим гормональним балансом було ефективним, але з часом ріст пагонів знижувався як і регенераційні показники.

Серед досліджуваних варіантів найбільш чутливими були всі чотири сорти мигдалю на третьому етапі МКР – мультиплікації.

Ефект накопичення проаналізовано на регенерантах 5, 7, 10 пасажів з різними концентраціями синтетичного цитокініну бензиламідопіріну на фоні 0,3 мг/л ІМК в таких концентраціях у мг/л: 0,3; 0,5; 1,0; 1,5 (контроль); 2,0; 2,5. У всіх сортах мигдалю в дослідях встановлено, що найвищі рослини *in vitro* були на варіанті з додаванням 1,0 мг/л БАП, що на 10–15 мм вище рослин на контролі, в перших п'яти пасажах, але в наступних пасажах їх ріст і коефіцієнт розмноження зменшувалися (рис. 4.5 б). Також такі рослини мали один пагін і, відповідно, менший коефіцієнт розмноження (табл. 4.5).

Таблиця 4.5

**Висота пагону регенерантів за різних концентрацій БАП за 5, 7, 10
пасажу методом накладання, мм**

Сорти/Концентрація	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5
Е5 Борозан	76/74/78	99/98/98	98/64/52	51/43/41	36/-/-
М41 Алекс	71/73/75	102/103/96	94/61/52	46/38/36	33/-/-
Джорджия	69/66/68	97/98/96	84/55/51	41/32/30	30/22/-
Луїза	67/66/64	94/92/95	85/82/56	44/33/33	18/-/-

Примітка: 5/7/10 – показники на п'ятому, сьомому і десятому пасажах.

На варіантах з більшими концентраціями цитокініну цей коефіцієнт спочатку зростав, але регенеранти були з ознаками гіпергідратації. Листкові пластинки видовжені і зменшених розмірів. І в наступних пасажах зменшувалася як довжина пагонів так і їх кількість в конгломераті. Окрім цього, такі рослини навіть за пересаджування на середовище з переважанням ауксинів над цитокінінами (БАП 0,3 та ІМК 1,5 мг/л) не формували кореневої системи.

Тривале пасажування на середовищах з комбінацією 0,3 БАП і 1,5 ІМК (комбінація для індукції ризогенезу) після п'ятого пасажу також призводило до втрати здатності до коренеутворення і морфогенезу з утворенням калусу (рис. 4.5 в).

За низкою досліджень, фітотоксичний гормональний дисбаланс *in vitro* у випадках високих концентрацій цитокінінів можна нівелювати додаванням гіберелінів [19]. Під час досліджень випробувано ефективність застосування наступної комбінації: БАП 2,5 мг/л, ІМК 0,3 мг/л та 1,5 мг/л гібереліну. За вказаної комбінації синтетичних гормонів у першому культивуванні в регенерантів мигдалю утворювалися конгломерати із 5–7 мікропагонів. Однак у наступних пасажах на середовищі з вказаною комбінацією синтетичних гормонів спостерігалися ознаки гіпергідратації: зменшувалися біометричні показники пагонів, стебло ставало тоншим, а листові пластинки були вузькими та закрученими (рис. 4.5 г).

Додавання одночасно високих концентрацій цитокініну БАП та ауксину ІМК призводило до інтенсивного калусоутворення (рис. 4.5 в). Ці гормони стимулюють поділ ядра і клітини в цілому. Додавання у високих концентраціях синтетичних аналогів обох класів гормонів призводило до втрати тканинами диференціації (калусоутворення) як окремих органів (наприклад, край листової пластинки), так і всього експлантату. Дедиференціація, як правило, відбувалася в базальній частині стебла живцевого експлантату та в місцях контакту листків із живильним середовищем.

Усі чотири сорти мигдалю в дослідженні були більш чутливими до надлишку гормонів. У мигдалю концентрації вище 1,5 мг/л формували темний калус з некротизацією 60 і більше відсотків. Після пересадки на середовище із 1,0–1,5 гібереліну в калусних тканинах відбувався непрямий морфогенез. Таким чином додавання 1,5 мг/л БАП та ІМК може бути використане для індукції калусогенезу в експлантів мигдалю.

На нашу думку, реакція на екзогенні гормони рослин пов'язана з активністю камбіальних тканин. Мигдаль має малу активність камбію, тому більш позитивно реагує на додавання екзогенних гормонів, зокрема цитокінінів.

Детермінація розвитку регенеранта фітогормонами є результатом взаємодії ендогенних гормонів і екзогенних синтетичних аналогів або речовин з прогормональною активністю. Їх кількісний і якісний стан, тобто, кількість та співвідношення між активними, зв'язаними та зруйнованими ферментами оксидоредуктазами змінюється протягом періоду культивування *in vitro*. Нами досліджено вплив віку материнських рослин донорів експлантів на онтогенез регенерантів.

Порівнювали онтогенез регенерантів з експлантів ізольованих із материнських рослин таких віків: 30, 45, 90, 120, 180 днів. Зокрема, встановлено вплив віку донорів живцевих експлантів на висоту регенерантів (табл. 4.6). В асептичних культурах обох ботанічних видів збільшення віку вихідних материнських рослин віком 120 та 180 днів позитивно вплинуло на висоту регенерантів. Висота регенерованих рослин на 5, 7, 10 пасажі залишалася без суттєвих змін.

У частини регенерантів із експлантів донорних рослин віком 180 днів спостерігалася спонтанне утворення коренів навіть на середовищі для мультиплікації. Візуально такі регенеранти мали потовщене стебло та листки з ширшою листковою пластинкою. У них були відсутні ознаки гіпергідратації тканин. Однак у випадках слабкої аерації, (наприклад, при технічних збоях системи вентилявання), культиваційних приміщень в регенерантів віком 120–180 днів, спостерігалися симптоми отруєння етиленом: міжжилкові хлорози, загальний хлороз та опадання листя. Відомо, що старі рослини можуть не лише самоотруюватися етиленом, але і бути джерелом цього леткого гормону для інших рослинних об'єктів в лабораторії [33, 60].

Водночас за масового розмноження з довгими проміжками між пасажуваннями (120–180 днів) є проблеми небіологічного характеру:

- порівняно низький коефіцієнт розмноження протягом року;
- збільшення собівартості;
- висихання живильного середовища;

- збільшення вторинного контамінування, яке складно виявити на старих за часом живильних середовищах.

Однак використання таких донорів є ефективним у випадках підтримання колекцій, періодичного усунення явищ із втратою регенераційного потенціалу та культурами що зменшують з кожним пасажом регенераційний потенціал.

Таблиця 4.6

Висота пагону регенерантів залежно від віку материнських рослин донорів експлантів на 5, 7, 10 пасаж методом пасажування накладанням (БАП 1,5, ІМК 0,3 мг/л), мм

Сорти/вік донорів	30	45	90	120	180
Е5 Борозан	28/-/-	54/52/36	98/84/52	101/111/113	143/148/149
М41 Алекс	17/-/-	47/43/26	94/81/52	98/95/103	141/146/145
Джорджия	-/-/-	36/33/-	84/65/51	89/91/92	103/105/104
Луїза	24/-/-	39/37/30	85/72/56	96/99/99	107/109/110

Примітка: 5/7/10 – показники на п'ятому, сьомому і десятому пасажі.

Використання маточних рослин у віці менше ніж 90 днів – зокрема 45 або 30 днів – є технологічно недоцільним, оскільки експланти з таких рослин втрачають здатність до морфогенезу, демонструють підвищену чутливість до надлишку цитокінінів, що спричиняє фітотоксичну дію, а також проявляють тенденцію до гіпергідратації тканин.

Не у всіх сортах мигдалю за пасажування на варіантах 30 і 45 днів вдалося до отримати здатні до прямого морфогенезу рослини 10 пасажу. Донори сортів мигдалю були уразливими до зниження віку – 45 і менше днів. По сорту Джорджия вже на п'ятий пасаж прямий морфогенез був відсутній. Втрата регенераційного потенціалу протягом таких пасажувань розпочиналася за послідовністю: вкорочення і потовщення пагона; розеточність; гіпергідратація; калусоутворення; некротизація.

Отже, протягом тривалого культивування *in vitro* під впливом неоптимальної дії трофічних і гормональних детермінант зазнає з часом

часткової дезорганізації процесів в онтогенезі. Введення в стан спокою є одним із прийомів перезавантаження системи детермінант, зокрема, й зміна гормонального статусу [29, 113]. Умовно бруньки майбутнього експланта на материнській рослині розпочинають з початку етапи органогенезу, і онтогенез регенованого з неї експланта в цілому. Особливості проходження етапів органогенезу і життєвого циклу рослини, регенованої з такого експланта детермінуватимуться новими умовами. А, отже, є велика ймовірність перезавантаження систем трофічних, фітогормональних детермінант, за яких усуваються фактори, що зумовлювали накопичення фітотоксичних речовин.

Для введення в стан спокою рослини регенеранти *in vitro* віком 90 діб поміщали у холодильні камери з поступовим зниженням температури протягом 10 діб із 24 до 2,0–4,0 °С. Виведення із цього стану проводили зворотнім підвищенням температури. Досліджено вплив тривалості перебування материнських рослин за таких періодів: 45, 90, 120 днів (табл. 4.7) на висоту потомства. За контроль взято потомство рослин, які не вводили в стан спокою (0 діб).

Таблиця 4.7

**Вплив тривалості стану спокою донорів експлантів на висоту пагонів
потомства, мм**

Сорти/вік донорів	0	45	90	120
Е5 Борозан	95	102	109	110
М41 Алекс	91	100	103	101
Джорджия	87	93	108	105
Луїза	84	98	112	121

Встановили, що порівняно з контролем варіанти із введенням донорів експлантів в стан спокою переважали за висотою регенованих рослин *in vitro*. У рослин мигдалю на варіантах із тривалістю спокою в 120 днів відбувалося утворення на бруньках криючих лусок, зміна кольору стебла яке властиве напівздерев'янілим пагонам цієї культури в природі. Варіант із спокоєм в 45 днів поступався варіантам в 90 і 120 днів. Материнські рослини

мали трав'янисті стебла та порівняно менші бруньки в пазухах листків. Також регенероване потомство мало менші прирости.

За показником висоти пагону регенероване потомство на варіантах «90» і «120» суттєво не відрізнялося. Однак регенеранти з варіанту з тривалістю спокою материнських рослин в 120 днів мали порівняно товстіший пагін та більш розгалужену кореневу систему.

Суттєвим перезавантаженням детермінант є четвертий етап МКР. Поряд з активацією генів носіями, що керують такими процесами як ксилемо- та коренеутворення, необхідним є експресія більш пізніх генів онтогенезу. Це зокрема, й утворення потовщених оболонок покривних тканин, підвищення стійкості до факторонестатичних умов *ex vitro*. Вчені встановили, що у мигдалю активні гени, які кодують захисні білки, були знайдені лише на пізнішій стадії онтогенезу порівняно з генами, які пов'язані процесами синтезу структурних білків, метаболізмом карбону і нітрогену [29, 111, 119]. У випадку останнього етапу МКР має відбутися перехід від глибокого ювенільного стану із гетеротрофним живленням до такого, в якому експресуються більш пізні гени онтогенезу.

Фотоавтотрофні методи мікроклонального розмноження (МКР) забезпечують отримання регенерантів, які одночасно адаптуються до умов після *in vitro*. Накопичення органічних речовин відбувається виключно автотрофним способом завдяки підвищенню фотосинтетичної активності. Анатомічно як материнські рослини, так і регенеранти є більш адаптованими до природних умов [19, 53, 54]. Раніше було доведено на ожині, фундуці ефективність і доцільність та адаптації таким методом [21, 24, 32, 132, 133, 161]. Однак в перші дні культивування присутнє часткове пошкодження фотоасимілюючого апарату інтенсивним освітленням (11 тис. люкс). Тому вважаємо, що перехід з «класичних» умов *in vitro* (2–3 тис. люкс освітлення, переважно гетеротрофне живлення) має передбачити проміжний передадаптаційний період.

Для визначення оптимальних умов проміжної адаптації (переадаптації) було порівняно ефективність росту регенерантів на трьох видах субстратів: кокосовому волокні, перліті та їх суміші у рівних об'ємних пропорціях у зволоженому стані (рис. 6).

Рослини культивували в одній групі варіантів в асептичних умовах 90 днів з автотрофним живленням (культуральні ємності об'ємом 250 мл), а в другій групі варіантів пересаджували 90-денні рослини, вирощені в асептичних умовах з гетеротрофним живленням в мікропарники з плівковою вологою камерою на 6 днів. Отже, адаптація до автотрофного живлення в одному випадку відбувалася під час регенерації з живцевого експланта в стерильних умовах, а в другому випадку регенеранти з гетеротрофного живлення тимчасово (на 6 днів) переносили на субстрат у вологій камері. Потім рослини переносили у фотоавтотрофний модуль з інтенсивним освітленням та повітрям із збагаченим вмістом вуглекислого газу. Встановили відмінності адаптації залежно від проходження переадаптації рослин регенерантів в умовах ФАМКР.

Отже, перехід рослин в умовах *in vitro* відбувався під час регенерації рослини з живця. А в другому випадку адаптація відбувалася на рівні сформованої рослини. На усіх трьох варіантах субстратів гірше приживалися рослини, що проходили переадаптацію *in vitro*. Проте опіки листкової пластинки були меншими. На нашу думку, це пов'язано із переходом ювенільного до старшого періодів онтогенезу, за яких зростає адаптаційний потенціал, але знижуються регенераційний [74].

Рослини-регенеранти після гетеротрофного живлення переадаптації у вологій камері втрачають частину фотоасимілюючого апарату, але завдяки ювенільному стану мають більші біометричні показники. Зокрема, за висотою вони переважали варіанти переадаптації в умовах *in vitro*.

Серед субстратів як в культуральних ємностях *in vitro*, так і в касетах вологої камери кращим був варіант з використанням суміші (1:1) кокосу та перліту.

4.3. Особливості мультиплікації *in vitro* кісточкових культур

В Україні вирощують як аборигенні, так і інтродуковані види кісточкових культур, зокрема, вишню, черешню, аличу, сливу, персик, абрикос, мигдаль та їхні гібриди [2, 39, 136, 143, 158, 163, 166, 169]. Основна мета культивування цих рослин – отримання плодів-кістянок, що мають тверду оболонку навколо насінини та соковитий, їстівний оплодень.

На відміну від зерняткових культур, у кісточкових верхівкові бруньки є вегетативними, тоді як генеративні розташовані збоку. Плодові бруньки зазвичай прості, тобто, з них формуються лише квітки та плоди, що призводить до оголення гілок після плодоношення.

Ріст гілок відбувається за рахунок верхівкової (кінцевої) бруньки. Така особливість формування вегетативних бруньок потребує специфічного підходу до живцювання кісточкових культур.

Особливості метаболізму кісточкових культур сформувалися еволюційно в природних умовах їхнього походження. Навіть в умовах *in vitro* зберігається система детермінант, зокрема трофічних [67, 134].

Кісточкові культури належать до родини Розові (*Rosaceae*), підродини Мигдалеві (*Amygdaloideae*) або Сливові (*Prunoideae*), а їхнє первинне походження пов'язане з Китайським (Східноазійським) центром окультурення рослин. Ця зона охоплює центральні та західні регіони Китаю, зокрема, басейн річки Хуанхе та прилеглі низинні райони, що характеризуються високими температурами, підвищеною вологістю та помірним вегетаційним періодом [20, 134].

Згодом, у більш сприятливих ґрунтово-кліматичних умовах та за високого рівня агрокультури виникли вторинні генетичні центри. Європа стала таким центром для доместифікації абрикоса, вишні, сливи та аличі.

Ґрунти, характерні для ареалу походження кісточкових культур, є багатими на поживні речовини, мають легкосуглинковий склад, добру дренуваність і високий уміст кальцію, часто карбонатні. Їхня кислотність наближена до нейтральної ($\text{pH} > 6,0\text{--}6,5$) [2].

Відповідно, ці рослини добре ростуть на поживних середовищах з підвищеним умістом мінеральних елементів, таких як середовища Мурасіге і Скуга або Куаріна-Лепувра [65, 128, 146].

Культитивування рослинної тканини також є важливим дослідницьким методом, що забезпечує створення стерильного та строго контрольованого середовища для росту в лабораторних умовах. Це дозволяє уникнути випадкових змін у поливі та фотоперіодах, які можуть ускладнювати виокремлення впливу окремих факторів, забезпечуючи дотримання принципу єдиної логічної відміни.

Покривні тканини кісточкових культур зазвичай мають глянцеvu поверхню та незначне опушення, що мінімізує їхнє фізичне та мікробіологічне забруднення порівняно з рослинами, які мають інтенсивне опушення [65].

Перед введенням в культуру ізольовані первинні експланти ретельно очищають від механічних забруднень та знезаражують у розчині антисептика. Для цього можуть використовувати 0,1 %-ний розчин хлориду ртуті [58], обробку етанолом (5 хв) із подальшим зануренням у розчин Доместосу (0,8 % гіпохлориту натрію) [71] або застосування Бланідасу 300 [12].

При введенні первинних експлантів кісточкових культур іноді спостерігається самоотруєння внаслідок окиснення фенольних сполук [19, 122]. Це найчастіше виявляється в експлантах, отриманих із швидкорослих пагонів. Щоб запобігти цьому явищу донорні рослини вирощують у розсіяному світлі, проводять декапітацію верхівок пагонів для стимуляції пробудження бічних бруньок. Додатково до живильних середовищ вводять антиоксиданти, такі як аскорбінова кислота [65].

Оптимальними періодами для введення вишні в культуру вважаються лютий та липень [158, 165], що збігається з виходом донорних рослин зі стану спокою та початком другої хвилі росту пагонів.

У верхівковій частині меристемного конуса відбувається поділ недиференційованих клітин, тоді як під конусом формуються тканини майбутніх органів. Наприклад, у меристемі пагона під зоною наростання

зкладаються зародкові (примордіальні) листки, а також покривні та провідні тканини. Діяльність апікальних меристем завершується утворенням квіткових органів, тому на генеративному етапі складно отримати експланти, здатні до регенерації прямим морфогенезом [168].

Вік донорних рослин впливає на адаптацію та морфогенез об'єктів *in vitro*. Дослідження на *Prunus avium* L. показали, що для успішного морфогенезу бруньок, ізольованих з материнських рослин різного віку (5 та 55 років), потрібні різні концентрації та комбінації цитокінінів і ауксинів. Це пояснюється відмінностями у вмісті ендогенних гормонів [138].

Поєднання ендогенних та екзогенних гормонів відіграє ключову роль у визначенні ефективності регенерації та онтогенезу загалом [53, 94].

Експланти, отримані від донорських рослин, розмножених *in vitro*, відзначаються вищим морфогенним потенціалом [139]. Для забезпечення ефективного оздоровлення за допомогою меристемних експлантів рекомендується використовувати донорські рослини, що перебувають на стадії вегетативного розвитку [19, 65].

Дослідження продемонстрували, що розмір меристем впливає на два взаємопов'язані, але протилежні показники: ефективність оздоровлення та здатність до регенерації. Із збільшенням розміру експлантів підвищується їхній регенераційний потенціал, але водночас зростає ризик наявності в них патогенів (вірусів, віроїдів, мікоплазм). Зокрема, для сорту *Prunus domestica* оптимальним вважається розмір меристем у межах 0,2–0,8 мм, що дає можливість отримати високий рівень регенерації при збереженні ефекту оздоровлення [108]. У дослідженнях Р. Druart та колег [39, 94] для оздоровлення вишні ефективно застосовували меристеми ще меншого розміру – близько 0,1 мм. За даними М. Ebrahimi з колективом [95, 165], меристеми мигдалю діаметром менш, ніж 0,5 мм не містили судин, і більшість із них були вільними від вірусних інфекцій. Застосування термотерапії та непрямого морфогенезу дозволяло підвищити відсоток оздоровлених рослин, оскільки віруси поширюються по провідних судинах, яких немає у калусних тканинах.

Крім того, відомо, що вірусні частки можуть переміщуватися не лише судинами, а й через розвинуті плазмодесми [120]. За використанні термотерапії слід зважати на те, що підвищення температури позитивно впливає на процес оздоровлення, але водночас зменшує кількість життєздатних меристемних експлантів [169].

Живильне середовище є ключовим елементом технології мікроклонального розмноження. Для культивування експлантів мигдалю зазвичай застосовують середовище MS, рідше – WPM [95, 126, 165] або QL [19, 65, 146]. Окрім того, турецькими дослідниками на основі досліджень складу ядра мигдалю було розроблено спеціалізоване середовище NRM для цієї культури [132]. Водночас універсального живильного середовища, яке б повністю відповідало потребам рослин на всіх етапах мікроклонального розмноження та забезпечувало тривале культивування, не існує. Тому на практиці використовують чергування різних середовищ або періодичне перенесення рослинних об'єктів на «розвантажувальні» середовища, які відрізняються складом мінеральних компонентів та концентрацією фітогормонів [24, 65, 122, 137].

Процеси засвоєння мінеральних речовин у рослинах відбуваються відповідно до законів живлення [65]. Елементи живлення класифікують за вмістом у рослинному організмі на макро-, мезо-, мікро- та ультрамікроелементи. Проте мінеральний склад штучних середовищ не завжди узгоджується з цими принципами. Наприклад, у середовищі Мурасіге і Скуга (MS) [128] кількість кальцію у формі хлориду ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$) становить 440 мг/л, при цьому частка хлору в цій сполуці перевищує 48 % (48,2288 %), що еквівалентно 212 мг/л. Для порівняння, вміст магнію у вигляді гептагідрату сульфату магнію дорівнює 370 мг/л, з яких магній становить лише 9,7 %, або майже 3,589 мг/л. Отже, в одному літрі такого поживного середовища міститься 212 мг хлору (мікроелементу) та всього 3,6–7 мг магнію (мезоелемента). У природних умовах на ґрунті хлор вимивається, тоді як у закритому культуральному посуді він накопичується в середовищі. З часом,

при поглинанні рослинами потрібних їм іонів, співвідношення хлору до інших іонів може суттєво зростати.

У середовищі WPM спостерігається подібна ситуація щодо мезоелемента сірки, яка надходить у склад таких солей (у мг/л): MgSO_4 – 180,7; K_2SO_4 – 990; MnSO_4 – 22,3; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 8,6; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 27,8.

Отже, у живильному середовищі відбувається порушення законів живлення, зокрема, проявляється ефект надлишку окремих елементів. Акумуляція фітотоксичного ефекту через це порушення підтверджує доцільність і результативність застосування розвантажувальних середовищ. В умовах *in vitro* додавання синтетичних екзогенних вуглеводів зумовлює міксотрофний характер живлення рослин, де переважає гетеротрофний тип [65]. У більшості протоколів дисахарид сахарози використовується як джерело вуглеводів [19, 65, 146, 118, 137], проте можливе використання й сорбіту [79, 112]. Ця сполука є основним компонентом флоємного соку рослин родини *Rosaceae*, міститься у значних кількостях у кісточкових культурах, зокрема, в плодах та фотоасимілюючих органах [147], а також слугує попередником для синтезу вітаміну С [65].

Сорбіт розглядається як перспективне джерело вуглеводів для мікроклонального розмноження *Prunus* spp. *in vitro* та є важливим фактором регуляції онтогенезу в контрольованих умовах [112, 148]. Наприклад, є дані про його позитивний вплив на проліферацію та вкорінення підщепи Garnem *in vitro* [74, 89, 91, 157, 163]. Дослідження Cristina Weiser Ritterbusch із колегами показали, що сорбіт у концентраціях 15 та 30 мг/л у середовищі QL сприяв активнішому утворенню мікропагонів та їхньому вкоріненню порівняно з тим же середовищем із додаванням сахарози [148].

Для регуляції онтогенезу експлантів кісточкових культур використовують рослинні гормони – цитокініни, ауксини та в окремих випадках гібереліни.

Після отримання асептичної культури процес морфогенезу під час мікроклонального розмноження проходить у два основні етапи:

- проліферація бруньок із формуванням розеток;
- утворення мікропагонів у цих розетках та подальше їх перенесення на середовище для вкорінення [19, 65].

Для стимулювання проліферації бруньок і формування розеток укорочених мікропагонів у живильні середовища, згідно з правилом Скуга-Міллера, вводять ауксини та цитокініни з перевагою цитокінінів [19, 24, 39, 44, 65].

Об'єктами досліджень виступають рослини з родини Розових (*Rosaceae*), роду *Prunus* (підродина *Amygdaloideae* або *Prunoideae*): вишня (*Prunus cerasus*) сорту Ксенія, черешня (*Prunus avium*) сорту Василіса та солодкий мигдаль (*Prunus amygdalus*) сорту Джорджія [39, 41, 136, 158, 165].

Мікроклональне розмноження на перших трьох етапах здійснювали в суворо стерильних умовах відповідно до загальноприйнятих методик [19, 119]. Для закладання асептичної культури використовували меристемні експланти, які були відібрані з рослини-донора та відповідно підготовлені для подальшого культивування (рис. 4.6).

На першому етапі дослідження особлива увага приділялася вивченню впливу онтогенетичної різноякісності – тобто, вікових і морфологічних особливостей різних частин вихідної рослини – на здатність експлантів до регенерації. Порівнювалися експланти, отримані з різних зон рослини (наприклад, верхівкових пагонів, пазушних бруньок тощо), щоб визначити їх морфогенетичний потенціал в умовах *in vitro*.

Усі варіанти культур закладали на стандартному стартовому поживному середовищі, приготованому за рецептурою Мурасіге і Скуга [128], яке відоме своєю універсальністю та ефективністю для ініціації ростових процесів у широкого спектра рослинних об'єктів.

На стадії мультиплікації було вивчено вплив трофічних чинників, зокрема особливостей мінерального живлення та джерел вуглеводів, а також гормональних детермінант на розвиток культур *in vitro*.

У ході досліджень застосовували базові варіанти живильних середовищ [84, 85, 90, 109, 130, 131, 132, 140], які відрізнялися за якісним та кількісним складом макро- і мікроелементів (табл. 4.8). До всіх варіантів середовищ стандартно додавали 1,0 мг/л бензиламінопурину (БАП) та 0,1 мг/л індолілмасляної кислоти (ІМК), що дозволяло забезпечити оптимальні умови для стимулювання проліферації клітин та ініціації ростових процесів.

Таблиця 4.8

**Склад модифікованих живильних середовищ в досліді із
культивування кісточкових культур *in vitro*, мг***

Компонент середовища	MS	MS _{1/2}	QL	WPM	NAM	NRM
1	2	3	4	5	6	7
Макросолі						
NH ₄ NO ₃	1650	825	400,0	400,0	900	530
KNO ₃	1900	800	1800	-	250	550
KH ₂ PO ₄	170	85	270	171	1550	1300
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	185	360	370	2050	1650
K ₂ SO ₄	-	-	990,0	-	-	-
Солі кальцію						
CaCl ₂	440	220	-	72,50	45	90
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	-	-	833,8	471,26	1050	700
Солі заліза						
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8	13,9	27,8	27,8	-	-
Na ₂ ·EDTA	37,3	18,65	37,3	37,3	-	-
Ferrilene 4.8 Orto-Orto	-	-	-		114,63	137,6
Мікросолі						
H ₃ BO ₃	6,20	3,10	6,2	6,2	11,0	6,5
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,0125	0,025	0,25	3,2	2,5
MnSO ₄ ·H ₂ O	16,90	8,45	0,76	22,3	6,0	20,00
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,125	0,25	0,25	0,1	0,25

<i>Продовження таблиці 4.8</i>						
1	2	3	4	5	6	7
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,60	4,30	8,6	8,6	11,0	8,6
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,0125	0,025	-	-	-
KI	0,83	0,415	0,08	-	-	-
Органічні компоненти						
Гліцин	2,00	1,00	1,00			
мезо-інозитол	100,00	50,00	100,00			
Нікотинова к-та (PP)	0,50	0,25	1,00			
Вітамін B1	0,50	0,25	1,0			
Вітамін B6	0,10	0,05	0,60			
Вітамін C	-	-	3,00			
Кінетин	0,2	0,1	1,0			
БАП *м/р	-	-	0,2/0,1			
ІОК *м/р	2,00	1,00	0,25/1,0			
ІМК *м/р	-	-	0,25/0,5			
Агар	7	3,5	7,0			
Цукроза	30	15	30			

Для оцінювання впливу різних джерел вуглеводів було випробувано чотири варіанти вуглеводного складу середовищ: 1 варіант – сахароза в концентрації 30 г/л; 2 варіант – комбінація сахарози 25 г/л та сорбіту 5 г/л; 3 варіант – сахароза 5 г/л та сорбіт 25 г/л; IV варіант – сорбіт 30 г/л.

Ці комбінації дозволяли проаналізувати як ефективність традиційного джерела вуглецю (сахарози), так і потенційний позитивний чи негативний вплив поліолів (сорбіту) на ріст мікропагонів.

Вплив гормональних чинників вивчали за допомогою цитокінінів: бензиламінопурину (БАП) та кінетину (Кн) у концентраціях 1 мг/л та 1,5 мг/л відповідно. Окремо було досліджено також ефект спільного застосування обох

регуляторів росту у концентраціях БАП 0,25 мг/л + Кн 0,75 мг/л на фоні постійної присутності 0,1 мг/л ІМК.

У процесі експерименту оцінювали такі показники:

- довжину утвореної кореневої системи;
- кількість мікропагонів, що формуються в конгломератах.

Результати дослідження дозволили комплексно проаналізувати вплив складу живильного середовища та гормональної композиції на морфогенетичні реакції експлантів і сформулювати рекомендації для оптимізації мультиплікації *in vitro*.

Оброблення експериментальних даних здійснювали за допомогою програмного забезпечення MS Excel. Вибір нульової або альтернативної гіпотези здійснювався на основі порівняння фактичних і критичних значень критеріїв достовірності при рівні значущості 5 %.

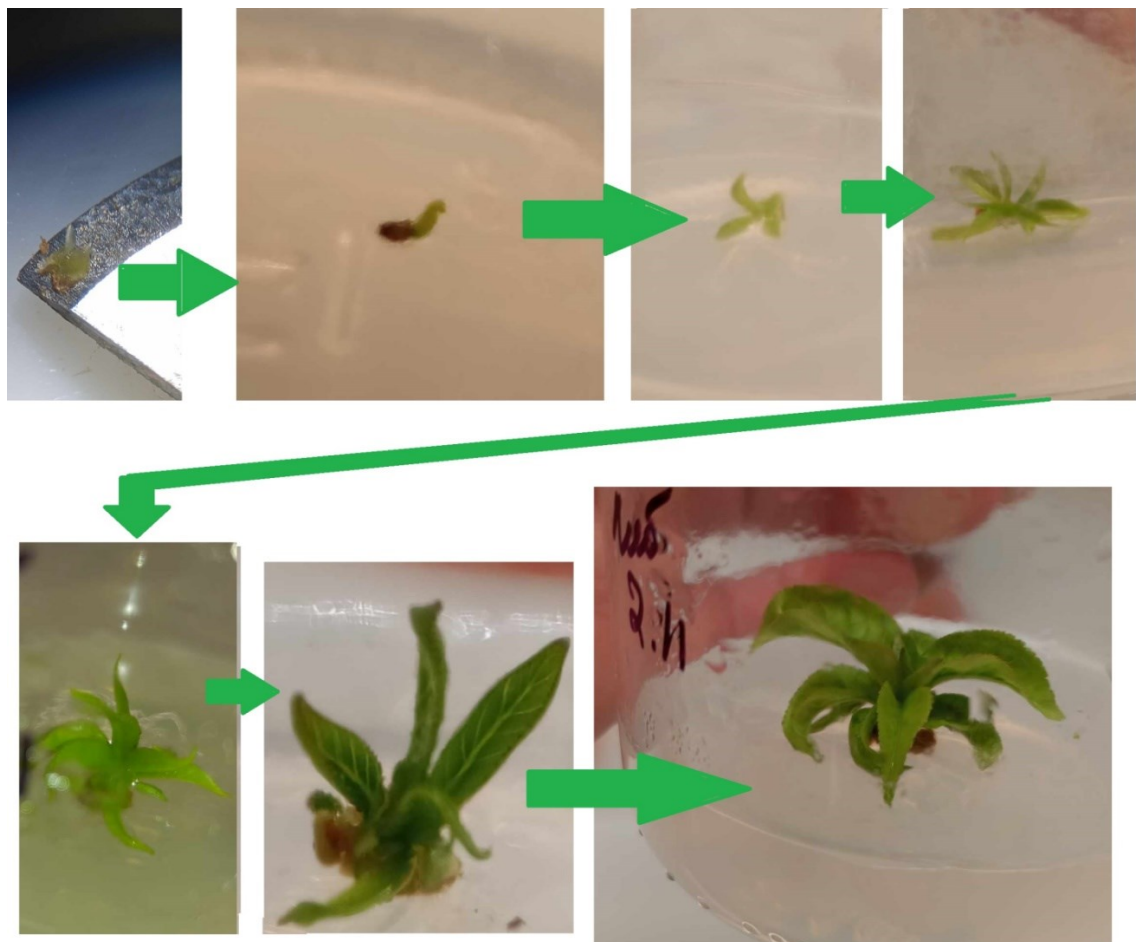


Рис. 4.6. Регенерація вишні від меристеми до розетки листків

Неоднорідний розвиток регенерантів кісточкових культур *in vitro* зумовлений онтогенетичною різномірністю окремих частин рослини-донора експлантів (рис. 4.7). Кожна зріла клітина рослинного організму містить повну генетичну інформацію, у якій закладено весь цикл розвитку – від формування зиготи до природної загибелі. Така клітина здатна шляхом поділу та диференціації започаткувати новий багатоклітинний рослинний організм. Це явище відоме як тотипотентність (омніпотентність). У процесі онтогенезу реалізація генетичної інформації відбувається вибірково, залежно від стадії розвитку організму та умов зовнішнього середовища. Генетичний код (генотип), закодований у специфічних послідовностях нуклеїнових кислот, проявляється у вигляді різних фенотипів під впливом факторів, що складаються під час онтогенезу. Отже, рослини з ідентичним набором ДНК та РНК можуть проявляти морфоанатомічні відмінності. Формування різних фенотипових ознак зумовлюється, зокрема, вибірковою та диференційованою експресією окремих генів, що входять до складу загального генотипу [152].



Рис. 4.7. Неоднорідність регенованого потомства мигдалю з різних частин донорної материнської рослини

Меристемні ділянки та бруньки, залежно від їх розташування на пагоні, відрізняються за вмістом ендогенних гормонів [53, 65]. Апікальні, медіальні та базальні бруньки на одному пагоні мають різні розміри та морфологічні особливості. Дослідження В.В. Мацкевича показали, що онтогенетична різnorodність меристемних брунькових експлантів впливає на розвиток нащадків під час вегетативного розмноження [65]. Це зумовлено відмінним співвідношенням гормонів стимулюючої та гальмівної дії, а також різницею між вмістом основних гормональних груп, зокрема, співвідношенням цитокінінів та ауксинів.

Для оцінювання цього співвідношення використовують показник, відомий як «цитокінінауксиновий індекс». Відповідно до правила Скуга-Міллера, за переважання цитокінінів над ауксинами пригнічується апікальне домінування та ризогенез, але активізується поділ клітин.

Неоднакові темпи росту та морфогенез живцевих експлантів також пояснюються особливостями формування у кісточкових культур вегетативних і генеративних бруньок, а також хвилеподібністю (періодичністю) ростових процесів [66]. Вегетативні бруньки локалізуються на верхівці пагонів, і саме з цих верхівкових бруньок після поновлення росту формуються нові пагони (рис. 4.8). Медіальні бруньки переважно дають початок квіткам, повільно зростаючим пагонам або нежиттєздатним експлантам (рис. 4.9).

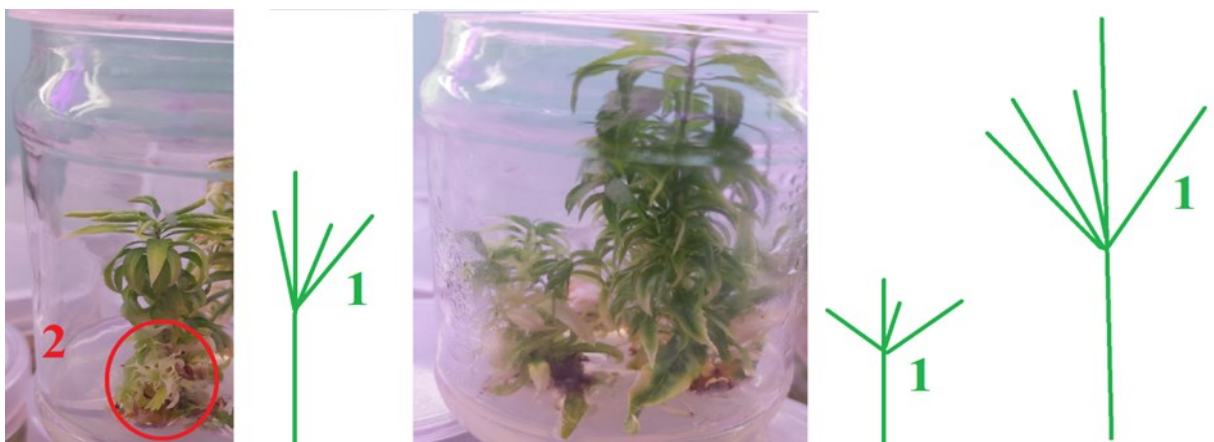


Рис. 4.8. Утворення пагонів із верхівкової вегетативної бруньки (1) та бічних (2), мигдаль

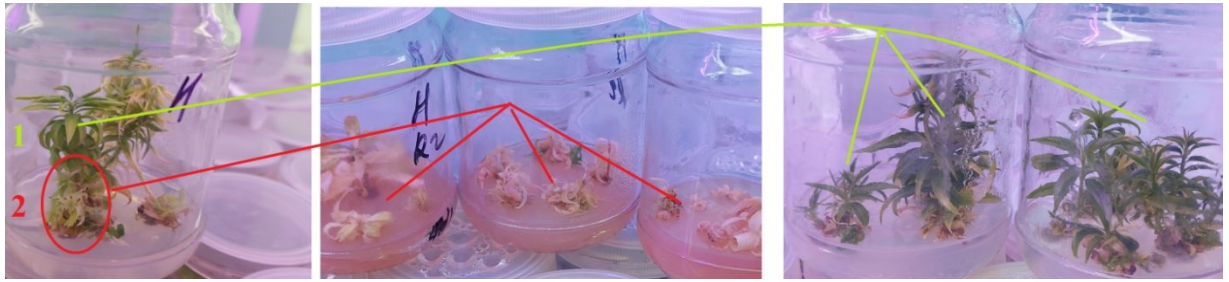


Рис. 4.9. Вплив походження експлантів на онтогенез регенерантів мигдалю, де: 1 – верхівка пагону; 2 – медіальна частина пагону

Окрім впливу ендогенних чинників, таких як гормони та кореляційні взаємозв'язки між органами рослини, важливу роль відіграє також трофічна детермінація. У нашому дослідженні було проаналізовано вплив різних за мінеральним складом поживних середовищ (табл. 4.9) на ефективність процесу мультиплікації шляхом поділу конгломерату мікропагонів (табл. 4.10). Варто підкреслити, що у всі варіанти середовищ додавали 1,0 мг/л бензиламінопурину та 0,1 мг/л індолілмасляної кислоти.

Таблиця 4.9

**Особливості трофічної детермінації регенерантів на етапі
мультиплікації на 45-й день спостереження**

Біометричний показник / середовище	MS	MS _{1/2}	QL	WPM	NAM	NRM
Вишня сорту Ксенія						
Кількість мікропагонів у конгломераті, шт.	3,0 ±0,02	3,3 ±0,03	2,7 ±0,01	2,8 ±0,01	2,8 ±0,02	2,9 ±0,03
Середня довжина мікропагону конгломерату, мм	19,6 ±0,09	49,9 ±0,26	52,4 ±0,26	13,3 ±0,33	56,8 ±0,28	44,1 ±0,22
Черешня сорту Василіса						
Кількість мікропагонів у конгломераті, шт.	3,1 ±0,01	3,6 ±0,02	3,0 ±0,02	3,2 ±0,01	2,8 ±0,04	2,7 ±0,03
Середня довжина мікропагону конгломерату, мм	19,2 ±0,09	38,7 ±0,19	50,3 ±0,25	10,2 ±0,05	44,9 ±0,22	33,6 ±0,16
Мигдаль сорту Джорджия						
Кількість мікропагонів у конгломераті, шт.	3,2 ±0,02	3,8 ±0,03	3,2 ±0,01	3,7 ±0,03	4,9 ±0,02	5,3 ±0,03
Середня довжина мікропагону конгломерату, мм	31,2 ±0,15	63,6 ±0,31	77,5 ±0,38	29,6 ±0,14	74,9 ±0,37	71,3 ±0,35

За критерієм «кількість мікропагонів у конгломераті» найкращі результати для вишні та черешні було отримано при культивуванні на середовищі MS_{1/2}. Саме на цьому варіанті поживного середовища спостерігалось найбільш інтенсивне утворення мікропагонів із експлантів. Водночас середовище QL забезпечувало формування мікропагонів найбільшої довжини, що свідчить про сприятливі умови для подовження клітин і активного росту пагонів.

Щодо мигдалю, найбільшу середню кількість мікропагонів на один експлант (5,3) було зафіксовано на середовищі NRM. Натомість максимальна висота мікропагонів, що становила 74,9 мм, спостерігалася при вирощуванні на середовищі NAM, що вказує на специфічний вплив складу макро- і мікроелементів на морфогенетичні процеси даного виду.

Середовище WPM виявилось найменш сприятливим за параметрами довжини пагонів: регенеранти, що вирощувалися на цьому середовищі, мали найменшу середню довжину. За кількістю утворених мікропагонів на WPM вишня показала гірші результати порівняно з іншими середовищами. Натомість черешня і мигдаль продемонстрували вищу кількість пагонів, ніж на середовищах MS та QL, хоча й поступалися результатами, отриманим на NRM, NAM і MS_{1/2}.

Крім того, на середовищі WPM часто спостерігалось явище гіпергідратації тканин (вітрифікації) [27, 31], що, ймовірно, пов'язано з підвищеним вмістом сполук сірки у складі цього середовища, які можуть впливати на водний обмін і структуру клітинних стінок.

Порівняльний аналіз усіх варіантів середовищ засвідчив обернену залежність: зі зменшенням кількості мікропагонів у конгломераті спостерігалось збільшення їхньої довжини, що вказує на конкуренцію за ресурси росту між окремими пагонами.

На основі отриманих результатів у подальших експериментах для мультиплікації вишні та черешні було обрано середовище MS_{1/2}, а для мигдалю – середовище NAM.

Оскільки на стадії мультиплікації важливим чинником розвитку рослинних експлантів за умов асептики і домінування гетеротрофного живлення є джерело вуглеводів, було проведено додаткові дослідження їхнього впливу (табл. 4.10). Результати показали, що для вишні та черешні оптимальними виявилися варіанти середовищ із 30 г/л сахарози або з поєднанням 25 г/л сахарози + 5 г/л сорбіту. Для мигдалю найбільш ефективним був саме варіант поєднання 25 г/л сахарози та 5 г/л сорбіту, що сприяло оптимальному розвитку мікропагонів і забезпечувало сприятливі умови для подальшої регенерації.

Таблиця 4.10

**Особливості формування конгломерату мікропагонів на стадії
мультиплікації на 45-й день спостережень залежно від джерела
вуглеводів**

Біометричний показник/вуглеводні, г/л	сахароза 30	сахароза 25 + сорбіт 5	сахароза 5 + сорбіт 25	сорбіт 30
Вишня сорту Ксенія				
Кількість мікропагонів в конгломераті, шт.	3,3±0,03	3,2±0,02	2,9±0,03	2,3±0,04
Середня довжина мікропагону конгломерату, мм	49,9±0,25	56,2±0,28	59,2±0,31	63,8±0,33
Черешня сорту Василіса				
Кількість мікропагонів в конгломераті, шт.	3,6±0,03	3,6±0,04	3,0±0,03	2,8±0,02
Середня довжина мікропагону конгломерату, мм	38,7±0,23	40,1±0,21	43,6±0,27	49,2±0,31
Мигдаль сорту Джорджия				
Кількість мікропагонів в конгломераті, шт.	4,9±0,05	5,0±0,03	4,1±0,03	4,0±0,02
Середня довжина мікропагону конгломерату, мм	74,9±0,33	83,2±0,29	89,6±0,38	90,8±0,48

Для досягнення високих коефіцієнтів розмноження під час мультиплікації (збільшення кількості мікропагонів у конгломераті) було

проведено дослідження впливу цитокінінів – бензиламінопурину (БАП) та кінетину (K_n) – у поєднанні з додаванням 0,1 мг/л індолілмасляної кислоти (табл. 4.11). Застосування БАП у порівнянні з кінетином призвело до таких результатів: зросла кількість мікропагонів у конгломераті, зменшилася їхня середня висота, а також збільшився відсоток вітрифікованих рослин із ознаками гіпергідратації тканин.

Введення цитокінінів та підвищення їх концентрації під час перших пасажів сприяло збільшенню кількості мікропагонів порівняно з контролем без цитокінінів. Зокрема, вищі концентрації (1,5 мг/л) БАПу та кінетину сприяли більш інтенсивному утворенню мікропагонів на першому пасажі у порівнянні з концентрацією 1,0 мг/л.

Однак протягом п'яти послідовних циклів живцювання на середовищах з БАП і підвищеною концентрацією кінетину спостерігалось поступове зменшення кількості мікропагонів. Зокрема, у регенерантів вишні сорту Ксенія при концентрації БАП 1,0 мг/л цей показник знизився з 3,2 до 2,9 на п'ятому пасажі, а за концентрації 1,5 мг/л кількість мікропагонів скоротилася вдвічі – з 4,3 до 2,1 на рослину. Отже, на п'ятому пасажі кращі результати спостерігалися на варіантах із меншою концентрацією цитокінінів.

За показником кількості мікропагонів варіанти з додаванням БАП перевищували результати варіантів із кінетином. Однак протягом п'яти пасажів на середовищах із кінетином спостерігалось повільніше зниження кількості мікропагонів. На нашу думку, це свідчить про менш активне накопичення фітотоксичних надлишків синтетичних цитокінінів [53, 60, 66]. У варіанті без цитокінінів також відзначалося поступове зменшення кількості мікропагонів, проте з кожним наступним пересаджуванням візуально проявлялися посилення апікального домінування та активізація ризогенезу.

У варіантах із кінетином, незважаючи на меншу кількість мікропагонів порівняно з БАП, утворювалися мікропагони із більшою середньою висотою стебла та більшими листовими пластинками. Кінетин сприяв також зменшенню частки регенерантів з ознаками гіпергідратації.

Поєднане застосування БАП у концентрації 0,25 мг/л та кінетину у концентрації 0,75 мг/л забезпечувало одночасне досягнення трьох бажаних ефектів: підвищену кількість мікропагонів (як при використанні БАП), більші розміри пагонів (стебел та листків), а також зменшення частки вітрифікованих рослин. Саме за такого поєднання формувалися регенеранти з оптимальними біометричними показниками, меншою схильністю до гіпергідратації та більш повільним накопиченням надлишку цитокінінів.

Таблиця 4.11

**Особливості гормональної детермінації регенерантів на стадії
мультиплікації на 45-й день спостережень**

Біометричний показник/ цитокінінін, мг/л	Без цитокінінів	БАП 1,0	БАП 1,5	К _н * 1,0	К _н 1,5	БАП 0,25 + К _н 0,75
Вишня сорту Ксенія						
Кількість мікропагонів в конгломераті, шт.	1,3±0,01 /1,2**±0,01	3,2±0,02 /2,9±0,03	4,3±0,03 /2,1±0,01	2,7±0,01 /2,5±0,02	3,1±0,02 /2,4±0,01	3,0±0,02 /3,0±0,01
Середня довжина мікропагону конгломерату, мм	59,2±0,29 /57,3±0,28	56,2±0,28 /44,7±0,22	43,7±0,21 /40,2±0,20	57,9±0,28 /57,8±0,28	57,3±0,28 /52,4±0,26	57,0±0,28 /57,2±0,28
Вітрифікованих регенерантів, %	-	2,9±0,03 /5,6±0,02	7,6±0,03 /11,5±0,05	-	1,3±0,0065 /2,1±0,03	0,2±0,001 /1,1±0,005
Черешня сорту Василіса						
Кількість мікропагонів в конгломераті, шт.	1,4±0,007 /1,2±0,006	3,0±0,01 /2,8±0,03	4,4±0,02 /2,9±0,03	2,9±0,03 /2,8±0,01	3,3±0,02 /3,1±0,01	3,6±0,01 /3,4±0,01
Середня довжина мікропагону конгломерату, мм	51,6±0,25 /50,3±0,25	41,6±0,20 /39,3±0,19	37,6±0,18 /31,2±0,15	48,7±0,24 /49,2±0,12	46,6±0,23 /41,3±0,20	43,6±0,21 /46,1±0,23
Вітрифікованих регенерантів, %	-	2,1±0,01 /3,8±0,01	14,3±0,07 /21,3±0,10	1,1±0,005 /1,3±0,006	-	0,3±0,001 /0,5±0,002

Продовження таблиці 4.11

1	2	3	4	5	6	7
Мигдаль сорту Джорджия						
Кількість мікропагонів в конгломераті, шт.	2,1±0,01 /2,0±0,01	3,7±0,01 /1,2±0,006	4,3±0,02 /1,1±0,005	3,6±0,01 /3,4±0,01	3,8±0,01 /3,1±0,01	4,1±0,02 /4,0±0,02
Середня довжина мікропагону конгломерату, мм	66,9±0,33 /62,4±0,31	49,2±0,24 /38,6±0,19	32,3±0,16 /12,6±0,06	44,9±0,22 /46,1±0,23	41,3±0,20 /36,6±0,18	53,9±0,26 /50,1±0,25
Вітрифікованих регенерантів, %	-	7,6±0,03 /15,9±0,07	14,3±0,07 /21,6±0,10	0,1±0,0005 /0,7±0,0035	1,9±0,0095 /2,8±0,01	0,5±0,002 /1,1±0,005

Примітка: скорочення Кн відповідає – кінетин; ** перше та п'яте живцеве покоління.

Надмірне оводнення тканин викликається сукупністю чинників: використанням незрілих рослин-донорів як джерела експлантів; зниженою кислотністю поживного середовища; надмірним азотним живленням, особливо при підвищеному вмісті азоту в амонійній формі [19, 65]. Це спричинює підвищення проникності цитоплазматичних мембран і зростання осмотичного тиску клітинного соку. Накопичення надлишкової кількості цитокінінів у клітинах рослин може мати тривалий вплив на їх фізіологічний стан, оскільки ці фітогормони здатні передаватися наступним поколінням під час вегетативного розмноження, зокрема шляхом живцювання [53, 65]. Така гормональна спадковість призводить до поступового накопичення негативних ефектів у культурі *in vitro*. Зокрема, з кожним новим пасажем збільшується частка рослин з ознаками вітрифікації — порушенням нормального водного балансу, яке проявляється у вигляді прозорих, ламких і водянистих тканин, непридатних до подальшого розвитку. Крім того, надлишок цитокінінів спричиняє посилення фітотоксичних ефектів, що проявляються у вигляді гальмування росту, деформацій органів, зміни пігментації або передчасного відмирання клітин. Ці зміни значно ускладнюють підтримання стабільної мікроклональної культури і знижують ефективність розмноження, особливо

при багаторазовому пасажуванні (рис. 4.10). Багаторазові спостереження у виробничих умовах підтвердили наявність зворотної залежності між рівнем вітрифікації та регенераційною здатністю, а також активністю ризогенезу.

Для нейтралізації накопичених фітотоксичних ефектів, спричинених незбалансованою дією трофічних і гормональних факторів, було випробувано метод гормонального перезавантаження рослинних об'єктів шляхом введення їх у стан спокою. У цей період, під час переходу рослинних бруньок у стан спокою та їх пробудження, відбуваються зміни у вмісті ендогенних і накопичених екзогенних гормонів: частина гормонів метаболізується, а інша переходить у зв'язану, неактивну форму [19, 53, 65, 122]. При поновленні ростових процесів активізуються ті гормони, які за формою та концентрацією відповідають початковим фазам онтогенезу.

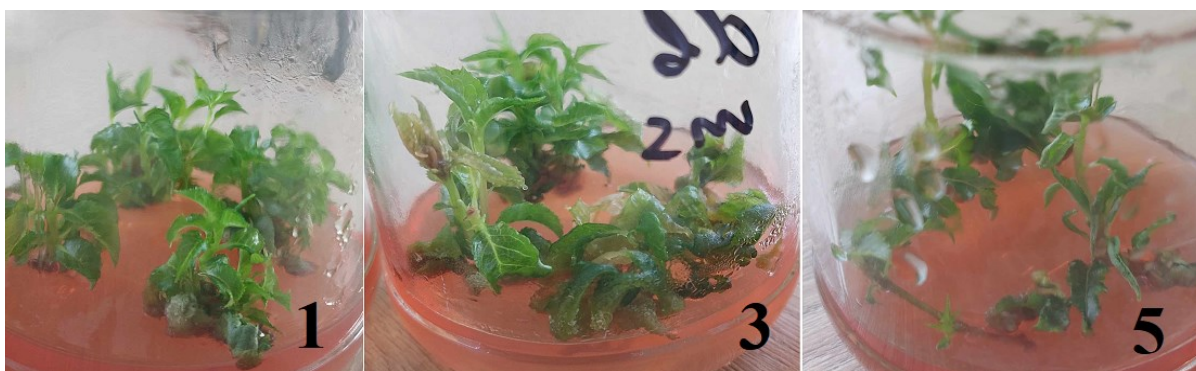


Рис. 4.10. Накопичення фітотоксичного ефекту через надлишкову кількість цитокініну БАП (1,5 мг/л) у вишні сорту Ксенія, де 1, 3, 5 – живцеві покоління на середовищі одного варіанту

Регенеранти, що після 45 днів культивування мали лише 1–2 мікропагони, відставали у розвитку та проявляли симптоми гіпергідратації, вводили у стан спокою в два етапи: спочатку протягом трьох тижнів утримували при температурі +12 °С та фотоперіоді по 8 годин на добу, після чого ще три тижні тримали в холодильнику при температурі +4 °С.

У результаті такого гормонального перезавантаження через введення у стан спокою було зафіксовано збільшення як середньої висоти мікропагонів, так і їх кількості. Крім того, у рослин після виходу зі спокою листові

пластинки були більшими порівняно з рослинами до проведення цієї процедури (рис. 4.11).

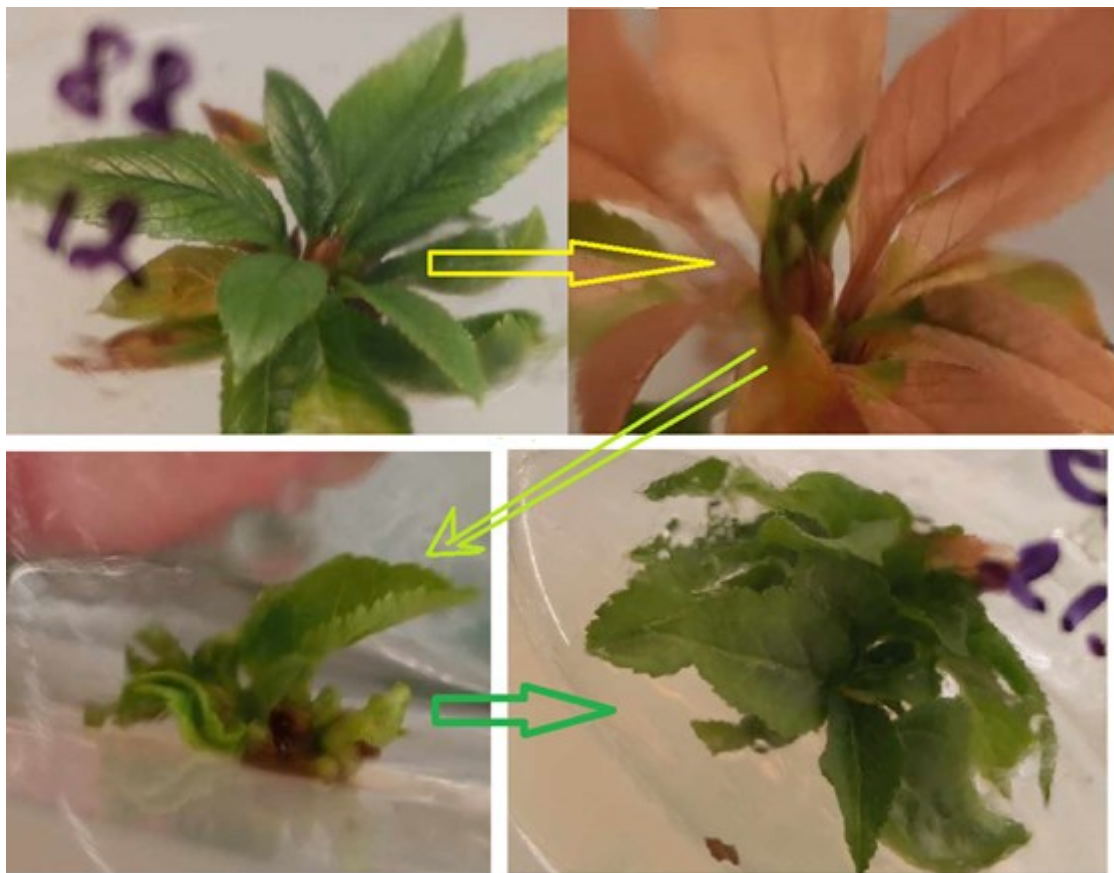


Рис. 4.11. Експланти черешні сорту Василіса, з ліворуч на право: один мікропагін до введення в стан спокою (верхівкова брунька вкривається лусками); пробудження верхівкової бруньки; початок утворення конгломерату пагонів та утворення листя умікропагонів

Висновки до розділу 4

Походження експлантів суттєво впливає на онтогенез регенерантів. Для успішного формування пагонів рекомендується використовувати верхівкові частини пагонів донорських рослин із вегетативними бруньками.

Щодо впливу складу живильних середовищ на ефективність розмноження шляхом поділу конгломерату мікропагонів встановлено: на середовищах, де формувалась менша кількість мікропагонів, їх довжина була більшою. Оптимальним середовищем за біометричними показниками для

вишні та черешні є MS 1/2, а для мигдалю – NAM із додаванням 1,0 мг/л бензиламінопурину та 0,1 мг/л індолілмасляної кислоти.

Щодо джерела вуглеводів визначено, що найкращими варіантами для вишні та черешні є середовища з додаванням 30 г/л сахарози або комбінації 25 г/л сахарози та 5 г/л сорбіту, а для мигдалю – суміш 25 г/л сахарози і 5 г/л сорбіту.

Спільне використання бензиламінопурину (0,25 мг/л) і кінетину (0,75 мг/л) сприяло підвищенню кількості мікропагонів (завдяки БАПу), збільшенню розмірів пагонів (стебла та листових пластинок) та зниженню частки вітрифікованих рослин.

Для усунення негативних фітотоксичних наслідків дисбалансу трофічних і гормональних факторів доцільно застосовувати введення рослин у стан спокою, що дозволяє досягти гормонального перезавантаження.

Також було виявлено вплив біологічних особливостей первинних експлантів – зокрема ботанічного виду та сорту – на ступінь отруєння тканин продуктами окиснення фенольних сполук.

Для регенерантів мигдалю усіх чотирьох сортів кращим було середовище NAM_{мод.}

Використання в якості донорів маточних рослин віком менше 90 днів було не доцільне.

Періодичне введення донорів експлантів в стан спокою є одним із заходів збереження тривалого і сталого пасажування мигдалю.

Стратегія мікроклонального розмноження (МКР) мигдалю передбачає формування розетки пагонів із верхівкової бруньки за рахунок індукції. Оскільки лише вегетативні бруньки пагона мають морфогенну здатність, розподіл пагона на одно- або двовузлові живці є технологічно недоцільним.

За матеріалами досліджень розділу 4 опубліковано 4 наукові праці [60, 66, 67, 122].

РОЗДІЛ 5.

ДЕТЕРМІНАЦІЯ РИЗОГЕНЕЗУ

5.1. Фітогормональні детермінанти коренеутворення

Перші три етапи виконуються в стерильних умовах *in vitro* [54]. Ефективність формування кореневої системи на завершальному етапі ризогенезу визначає успішність приживлення та адаптації рослин *ex vitro* [45, 70].

Ризогенез – це процес утворення коренів *de novo*. Схожі поняття – адвентивне коренеутворення та укорінення. Ця властивість має важливе біологічне значення, оскільки забезпечує відтворення рослини, ідентичної материнській, із збереженням її генетичної стабільності. Більшість технологій мікроклонального розмноження передбачає укорінення мікропагонів або живцевих експлантів [81, 82, 96].

Органи, зокрема корені, які формуються у незвичних для цього місцях, є адвентивними [117, 130, 155]. Еволюційно корінь виник як важливий ароморфоз – адаптація, необхідна для життя рослин на суходолі. Завдяки кореневій системі папоротеподібні та еволюційно розвиненіші класи рослин отримали кращу пристосованість до умов довкілля.

У природних умовах (*in vivo*) процес регенерації у живців починається з утворення суберинового покриву на поверхні зрізу, під яким формується пробковий захисний шар. За таких умов адвентивне коренеутворення проходить у кілька етапів: суберинізація, пробковіння, калусогенез (у деяких випадках калус може не утворюватися) і, власне, ризогенез.

При травмуванні зрізу відбувається дедиференціація клітин паренхіми та утворення калусу. Під час диференціації клітини калусу трансформуються у захисні тканини, а також у тканини, які накопичують поживні речовини, що згодом використовуються для формування коренів.

У більшості деревних рослин у камбіальній зоні, на вершині серцевинного променя, в результаті мітотичного поділу ініціальних клітин утворюються меристемні вирости.

Частина клітин меристем диференціюється у тканини кореня, включаючи провідні, покривні тканини та клітини кореневого чохла. Провідні тканини новоутворених адвентивних коренів з'єднуються з флоємою та ксилемою пагону.

Корені можуть утворюватися також через ініціацію калусних тканин, які з'являються в основі бруньок. Процес утворення коренів, або ризогенез, поділяється на дві фази: ендогенний ризогенез (перша фаза), коли корені формуються всередині тканин, і екзогенний ризогенез (друга фаза), при якому корені з'являються на зовнішніх частинах тканин.

Здатність пагонових живців до регенерації залежить не лише від виду рослини, але й від того, з якої частини донорної рослини вони були отримані. Це, в свою чергу, впливає на процес утворення адвентивних коренів [10, 66].

Ризогенез визначається як ендогенними, так і екзогенними чинниками. Серед них ключову роль відіграють фітогормони та їх синтетичні аналоги. Формування пагонів і коренів регулюється співвідношенням цитокінінів та ауксинів. За переважання ауксинів процеси спрямовуються на посилення апікального домінування, розвиток ксилеми та ризогенез.

У мигдалю в умовах *in vitro* реакція на тип ауксину має сортову специфічність. Окрім синтетичних аналогів ауксину, на ризогенез впливають рівень ендогенних гормонів, стан експланта, трофічні фактори (залежно від складу та доступності елементів живлення), затінення, використання активованого вугілля, екзогенні джерела вуглеводів та інші фактори [19, 22, 29, 65].

На середовищі NAM були протестовані різні концентрації ІМК як фактор, що визначає ризогенез мигдалю в умовах *in vitro* (табл. 5.1). У контрольному варіанті ІМК не додавали, а фонова концентрація БАП становила 0,125 мг/л.

Ризогенез у культурі *in vitro* є складним багатофакторним процесом, який формується під впливом як ендогенних, так і екзогенних чинників. Серед численних регуляторів цього процесу ключову роль відіграють фітогормони природного походження та їхні синтетичні аналоги, що активно впливають на напрямки та інтенсивність диференціації клітинних структур.

Одним із основних механізмів регуляції морфогенезу в умовах *in vitro* є співвідношення концентрацій цитокинінів та ауксинів у живильному середовищі. Переважання ауксинів сприяє посиленню апікального домінування, стимуляції розвитку ксилеми та активації процесів ризогенезу, тоді як підвищений рівень цитокинінів, навпаки, активізує пагоногенез і сприяє формуванню бруньок.

У випадку мигдалю було встановлено, що реакція експлантів на різні типи ауксинів має сортову специфічність, що підкреслює необхідність урахування генотипічних особливостей при розробці протоколів мікроклонального розмноження даної культури.

Окрім використання синтетичних аналогів ауксинів, на ефективність ризогенезу істотно впливають інші фактори, серед яких: рівень ендогенних фітогормонів у тканинах експланта, що визначає їх базову морфогенетичну активність; фізіологічний стан експлантів, зокрема вік, ступінь диференціації та накопичення вторинних метаболітів; трофічні умови, обумовлені складом та доступністю макро- та мікроелементів у живильному середовищі; інтенсивність освітлення або рівень затінення, що може змінювати гормональний баланс; використання активованого вугілля для адсорбції надлишку фітогормонів і фенольних сполук; наявність екзогенних джерел вуглеводів, що виступають не тільки енергетичними, а й осмотичними регуляторами росту, а також інші фізико-хімічні фактори середовища [19, 22, 29, 65].

З метою оптимізації ризогенезу в умовах *in vitro* у ході експерименту було протестовано різні концентрації індолілмасляної кислоти (ІМК) на живильному середовищі NAM (табл. 5.1). У контрольному варіанті ІМК не

додавали, що дозволило визначити базову регенераційну здатність експлантів за умов наявності лише фонового рівня цитокінінової стимуляції – 0,125 мг/л бензиламінопурину (БАП).

Таблиця 5.1

Детермінація коренеутворення в регенерантів мигдалю *in vitro*

Сорт	Концентрація ІМК, мг/л	контр	0,125	0,250	0,500	0,750	1,000	1,250
Джорджия	Початок ризогенезу, днів	41	40	36	33	33	33	37
	Довжина коренів на 45 день	0,6	0,6	0,9	1,4	1,6	1,7	1,3
	Кількість коренів на 45 день	1,7	2,3	2,5	2,7	2,8	2,8	2,1
Е5 Борозан	Початок ризогенезу, днів	39	37	37	32	32	31	30
	Довжина коренів на 45 день	8	12	14	15	16	16	8
	Кількість коренів на 45 день	0,6	0,9	1,3	1,9	2,2	2,1	1,9
Луїза	Початок ризогенезу, днів	44	41	40	39	38	37	37
	Довжина коренів на 45 день	1,8	2,9	7,9	11,4	15,9	10,0	8,4
	Кількість коренів на 45 день	1,0	1,6	1,9	2,2	2,7	2,6	2,1
М41 Алекс	Початок ризогенезу, днів	42	40	40	39	36	36	34
	Довжина коренів на 45 день	3	8	9	14	15	14	6
	Кількість коренів на 45 день	0,3	0,5	1,6	1,9	1,9	2,0	1,4

Серед досліджених концентрацій синтетичного аналога ауксину – індолілмасляної кислоти (ІМК) (0 – контроль; 0,125 мг/л; 0,250 мг/л; 0,500 мг/л; 0,750 мг/л; 1,000 мг/л; 1,250 мг/л) на фоні 0,125 мг/л БАП, для

досліджуваних сортів найкращий показник коренеутворення було досягнуто за концентрації ІМК 0,750 мг/л у штучному живильному середовищі.

За нижчих концентрацій ІМК показники коренеутворення були слабшими. Збільшення концентрації ІМК від 0,750 до 1,000 мг/л не призводило до суттєвого підвищення інтенсивності ризогенезу. За застосування більш високих концентрацій ІМК спостерігалось уповільнення коренеутворення, що, на нашу думку, пов'язано з фітотоксичною дією цих концентрацій [53].

У дослідженнях на сорті Джорджія, крім ІМК, було випробувано й інші синтетичні сполуки з ауксиною активністю (рис. 5.1). Природним ауксином є β -індолілоцтова кислота, яка може існувати у вільній або зв'язаній формах. Її інактивують ферменти, зокрема ауксиноксидаза та пероксидаза [6, 84, 97, 100]. Деякі синтетичні сполуки з ауксиною активністю є більш стійкими до метаболізації цими ферментами [53].

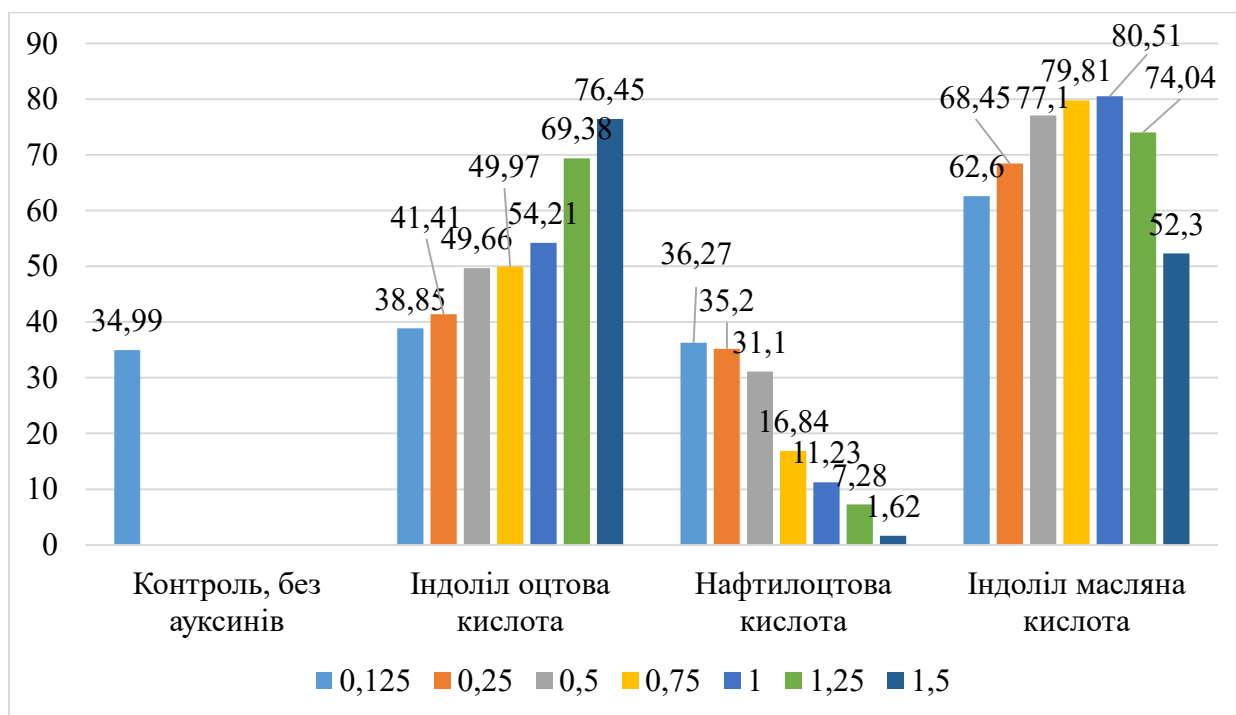


Рис. 5.1. Вплив фітогормонів на відсоток укорієних регенерантів сорту Джорджія на 45-й день культивування в умовах *in vitro*

У нашому дослідженні найбільший відсоток регенерантів із коренями був отриманий при застосуванні індо́лілмасляної кислоти (ІМК).

Нафтилоцтова кислота та індолілоцтова кислота поступалися ІМК за цим показником. У варіантах із використанням індолілоцтової кислоти (ІОК) максимальний відсоток регенерантів із коренями спостерігався при концентрації 1,5 мг/л. Ще нижчий відсоток укорінених регенерантів був на середовищах із нафтилоцтовою кислотою.

Регенеровані рослини, отримані в результаті експериментів, характеризувалися укороченою, але потовщеною кореневою системою [54, 170], що вказує на особливості їх розвитку *in vitro*. У багатьох регенерантів спостерігалися калусні нарости в базальній частині пагонів, які мали діаметр від 3 до 10 мм. Це явище свідчить про активні процеси клітинного поділу та утворення нових тканин на початкових стадіях коренеутворення.

У результаті досліджень було встановлено, що для стимуляції укорінення *in vitro* у сорту Джорджія найбільш ефективним ауксином є індоліл-3-масляна кислота (ІМК), яка забезпечує найкращі результати коренеутворення. Оптимальна концентрація ІМК для цього процесу становить 1,000 мг/л. Індоліл-3-оцтова кислота (ІОК) також позитивно впливала на ризогенез, але її ефективність була нижчою, ніж у випадку з ІМК. З іншого боку, нафтилоцтова кислота (НОК) не сприяла утворенню коренів і навіть може мати токсичний ефект при підвищених концентраціях, що негативно впливає на розвиток кореневої системи та загальний стан рослин.

5.2. Ендогенні детермінанти донорів експлантів

Ризогенез, процес утворення коренів, регулюється гормональними факторами (табл. 5.2), що включають різні комбінації ендогенних і синтетичних екзогенних гормонів. Крім того, на цей процес впливають морфофізіологічні та анатомічні особливості експлантів. Одним із основних факторів, що впливає на коренеутворення, є співвідношення ауксинів і цитокінінів, при якому переважаання ауксинів має важливе значення для стимуляції ризогенезу. Коренеутворення відбувається навіть у варіантах без

додавання синтетичних аналогів гормонів, що можна пояснити наявністю ендогенних фітогормонів у рослинах [82, 96, 97].

Дослідження на безгормональному середовищі показали різні результати для різних сортів. Для сорту Е5 Борозан на безгормональному середовищі утворювалося в середньому 1,6 мікропагонів на регенерант із 63 % укорінених. У сорту Алекс спостерігалось 1,9 мікропагонів із 56 % укорінених регенерантів, а для сорту Джорджия утворювалося 2,3 мікропагонів, при цьому тільки 13 % регенерантів були укорінені. У сорту Луїза утворювалося 2,2 мікропагонів із 15 % укорінених.

Таблиця 5.2

Коефіцієнт розмноження та укорінення регенерантів *in vitro* залежно від умов культивування донорів експлантів на середовищі MS при віці донорів 45 днів

Синтетичний аналог гормонів, мл	Без гормонів	БАП 1,0	ІМК 1,0	БАП 1,0; ІМК 0,25	БАП 0,25; ІМК 1,0
М41 Алекс					
Кількість мікропагонів у конгломераті, шт	1,9 ± 0,4	3,9 ± 0,7	1,3 ± 0,3	4,0 ± 0,6	2,0 ± 0,4
Укорінених регенерантів, %	56 ± 4	4 ± 1	71 ± 5	12 ± 2	83 ± 6
Е5 Борозан					
Кількість мікропагонів у конгломераті, шт	1,6 ± 0,3	3,6 ± 0,3	1,2 ± 0,2	3,7 ± 1,1	1,9 ± 0,5
Укорінених регенерантів, %	63 ± 4	3 ± 2	74 ± 6	9 ± 3	79 ± 6
Луїза					
Кількість мікропагонів у конгломераті, шт	2,2 ± 0,4	3,8 ± 0,3	1,6 ± 0,4	4,1 ± 1,1	2,5 ± 0,5
Укорінених регенерантів, %	15 ± 5	5 ± 3	71 ± 6	6 ± 2	74 ± 5
Джорджия					
Кількість мікропагонів у конгломераті, шт	2,3 ± 0,4	4,1 ± 1,1	1,9 ± 0,4	4,3 ± 1,1	2,6 ± 0,5
Укорінених регенерантів, %	13 ± 3	4 ± 1	67 ± 5	9 ± 3	69 ± 5

Ці результати також продемонстрували обернену залежність між кількістю мікропагонів у конгломераті та часткою укорінених регенерантів. Тобто, чим більше мікропагонів утворювалося в конгломераті, тим менше

було укорінених регенерантів. Це явище, ймовірно, пов'язано зі зміною активності атрагуючих центрів (ті, що сприяють утворенню коренів), але не призводить до суттєвих змін у метаболізмі основних будівельних речовин рослин. Це може бути результатом біологічних особливостей окремих сортів рослин [81, 96].

При тривалому культивуванні на середовищі без гормонів вже на третьому пасажі частина експлантів втрачає здатність до регенерації. У культуральних ємностях з п'яти експлантів регенерацію демонструють 1–2 найбільші за розміром експланти, які формують рослини з одним мікропагоном та слабо розвиненою кореневою системою (рис. 5.2).

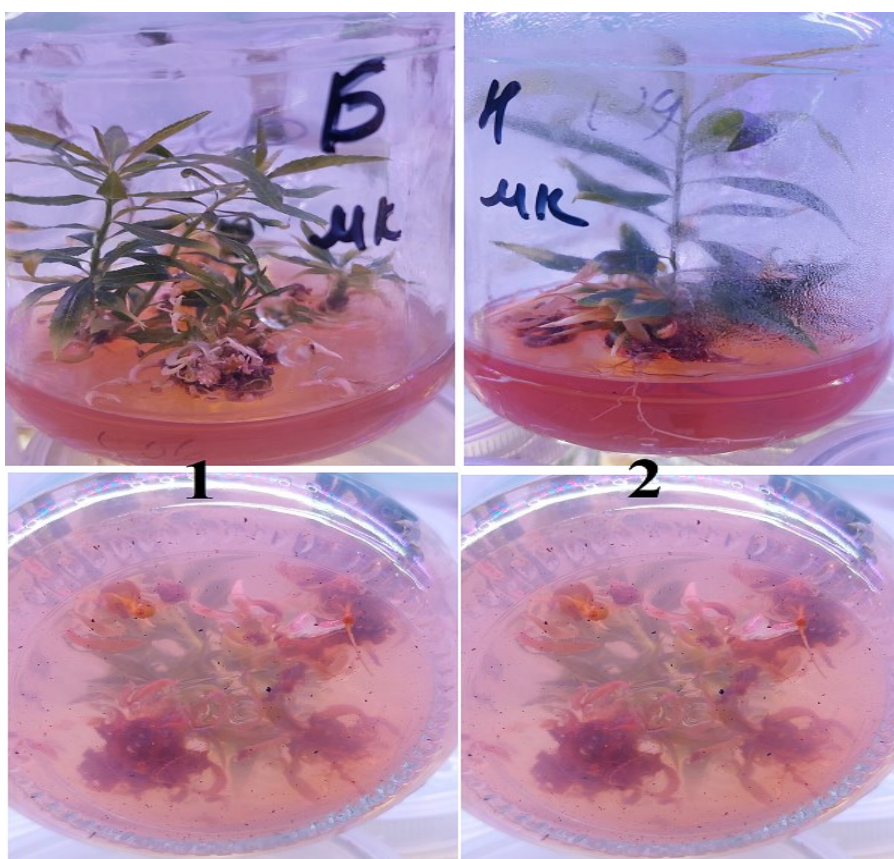


Рис. 5.2. Регенерація рослин *in vitro* із експлантів на безгормональному середовищі, де 1 – перший пасаж; 2 – третій пасаж

Вплив біологічних особливостей сорту спостерігався і на інших варіантах дослідження. Найбільшу кількість мікропагонів утворювали сорти на варіанті з БАП 1,0 мг/л та ІМК 0,25 мг/л: Е5 Борозан – 3,7 шт., Алекс – 4,0 шт., Джорджия – 4,3 шт., Луїза – 4,1 шт. У всіх сортів ця кількість

мікропагонів у конгломераті була вищою порівняно з варіантом, де використовувався лише БАП (1,0 мг/л).

Серед регенованих рослин найбільшу кількість екземплярів із коренями зафіксовано у сортів Е5 Борозан і Алекс порівняно з Джорджия та Луїза. Варіант із комбінацією БАП 0,25 мг/л та ІМК 1,0 мг/л виявився найефективнішим для ризогенезу: у сорту Е5 Борозан – 79 %, Алекс – 83 %, Джорджия – 69 %, Луїза – 74 %. Ці показники перевищували результати як на безгормональному середовищі, так і у варіанті з додаванням лише ауксину (ІМК 1,0 мг/л).

Як синтетичні, так і ендогенні гормони можуть накопичуватися в тканинах донорів у різних формах, зокрема, і в активній формі, створюючи запас [82, 117]. Тривале культивування та живцювання донорів, які використовуються для мікроклонального розмноження, впливає на особливості індукції ризогенезу у їхніх експлантів, оскільки онтогенез материнських рослин залежить як від трофічних, так і гормональних факторів [6, 29, 53, 65].

Встановлено, що вирощування донорів експлантів на середовищах із різним гормональним складом впливає на кількість мікропагонів у конгломераті та відсоток укорінених рослин. Наприклад, на середовищі з 0,25 мг/л ІМК та 0,1 мг/л БАП регенеранти демонстрували різні показники укорінення (табл. 5.3).

Таблиця 5.3

Коефіцієнт розмноження та укорінення регенерантів *in vitro* на середовищі із 0,25 ІМК та 0,1 БАП залежно від умісту синтетичних цитокінів при вирощуванні донорів експлантів за різних комбінацій ауксину ІМК та цитокініну БАП

Синтетичний аналог гормонів, мл	без гормонів	БАП 1,0	ІМК 1,0	БАП 1,0; ІМК 0,25	БАП 0,25; ІМК 1,0
М41 Алекс					
Кількість мікропагонів у конгломераті, шт	1,3 ± 0,3	4,2 ± 2	1,1 ± 0,2	4,1 ± 0,9	1,6 ± 0,3
Укорінених регенерантів, %	18 ± 2	4 ± 1	70 ± 5	11 ± 2	84 ± 5

Е5 Борозан					
Кількість мікропагонів у конгломераті, шт	$1,1 \pm 0,3$	$4,1 \pm 1$	$1,0 \pm 0,2$	$3,9 \pm 1,1$	$1,4 \pm 0,5$
Укорінених регенерантів, %	26 ± 3	3 ± 2	79 ± 6	9 ± 3	87 ± 6
Луїза					
Кількість мікропагонів у конгломераті, шт	$1,4 \pm 0,2$	$4,0 \pm 1,1$	$1,6 \pm 0,3$	$4,1 \pm 1,1$	$2,6 \pm 0,9$
Укорінених регенерантів, %	11 ± 3	2 ± 1	74 ± 4	9 ± 3	86 ± 6
Джорджия					
Кількість мікропагонів у конгломераті, шт	$1,6 \pm 0,3$	$4,5 \pm 1,2$	$1,1 \pm 0,2$	$4,2 \pm 1,1$	$2,0 \pm 0,3$
Укорінених регенерантів, %	$11 \pm$	$2 \pm 0,9$	73 ± 5	9 ± 4	81 ± 5

Для аналізу впливу донорів на ризогенез досліди проводили на середовищі MS, щоб чіткіше виявити відмінності, які могли бути менш очевидними на середовищах NAM або NRM [132, 133].

На безгормональному середовищі укорінення потомства донорів становило від 11 % до 26 % при кількості мікропагонів від 1,1 до 1,6. Найбільша кількість регенерантів із кореневою системою була отримана з експлантів, вирощених на середовищі з 1,0 мг/л ІМК у поєднанні з 0,25 мг/л БАП (найменша концентрація цитокініну в досліді). Водночас донори, вирощені на середовищі з 1,0 мг/л ІМК без додавання БАП, продемонстрували меншу кількість рослин із коренями.

За результатами дослідження, які представлено таблиці було встановлено, що використання цитокініну (БАП) у концентрації 1,0 мг/л сприяло інтенсивному утворенню мікропагонів, проте негативно впливало на процес укорінення. Ауксин (ІМК) у концентрації 1,0 мг/л значно підвищував рівень укорінення, особливо в поєднанні з 0,25 мг/л БАП. Оптимальним співвідношенням регуляторів росту для ефективного мікроклонального розмноження *in vitro* є БАП 0,25 мг/л + ІМК 1,0 мг/л, що забезпечує високу продуктивність культури та максимальний рівень укорінення.

5.3. Вікові особливості експлантів

Окрім віку донорів експлантів та накопичення ними ендогенних гормонів, здатність ізольованих експлантів регенерувати рослини *in vitro* залежить від умов культивування материнських рослин, зокрема від вмісту синтетичних аналогів гормонів у живильних середовищах [84, 85, 90, 109, 130]. Вирощування донорів на середовищах із переважанням ауксинів над цитокінінами стимулює ризогенез вже у самих донорів, що позитивно впливає на їх потомство [4, 52]. Такі експланти мають добре розвинену провідну систему, дозрілі бруньки та ознаки апікального домінування [34, 170].

Проте у мигдалю технологічно придатними для розмноження *in vitro* є лише верхівки пагонів, тоді як живці медіальної та базальної частин пагонів не забезпечують формування повноцінних рослин [80, 86, 87, 97, 100, 101, 102]. Досягти достатньої кількості мікропагонів можливо лише за допомогою надлишку цитокінінів, що індукує утворення конгломерату мікропагонів, проте цей процес обернено залежить від індукції ризогенезу [4, 52, 170].

Отже, для промислового розмноження *in vitro* важливо визначити оптимальну комбінацію гормонів, яка сприятиме одночасному формуванню конгломерату мікропагонів та індукції коренеутворення, враховуючи дію як синтетичних гормонів, так і ендогенних факторів.

Вміст ендогенних гормонів, накопичення екзогенних синтетичних аналогів, їх метаболізація, зберігання в запасі та перехід у неактивні форми залежать від стану рослини, зокрема її віку [133, 139, 150]. Це впливає на особливості регенерації експлантів, ізольованих із материнських рослин різного віку [29, 80, 86, 130, 154].

У наших дослідженнях було вивчено особливості ризогенезу регенерантів, отриманих із експлантів донорів віком 15, 30, 45, 60, 75 та 95 днів (табл. 5.4). Використання експлантів із 15-денних донорів виявило їх менші розміри порівняно з іншими варіантами, зокрема бруньок та стебел. Регенеранти, отримані з цих експлантів, також мали менші розміри пагонів. Наприклад, у сорту Джорджия висота регенерантів із 15-денних донорів

становила 26 мм, тоді як у регенерантів із 45-денних донорів і старших – 74–102 мм. У сорту М41 Алекс початок ризогенезу спостерігався на 27-й день культивування, тоді як у інших сортів на цьому етапі (30-й день) ознак ризогенезу не зафіксовано.

Таблиця 5.4.

Характеристики регенерації пагонових експлантів залежно від віку донорів на 30-й день спостережень на середовищі MS із додаванням 0,25 мг/л БАП та 1,0 мг/л ІМК

Показник / вік донора, днів	сорт	15	30	45	60	75	90
Висота регенеранта, мм	Е5 Борозан	23 ± 2	27 ± 3	76±3	96±4	93±5	94±4
	М41 Алекс	35 ± 3	49±3	89±4	114±6	126±6	111±6
	Джорджия	16±2	26±4	74±3	77±4	97±5	102±6
	Луїза	13±2	24±2	68±5	76±5	74±4	75±3
Кількість скловидних регенерантів	Е5 Борозан	100±6	65±3	12±3	6±2	5 ± 1	5±4
	М41 Алекс	77±4	63±4	8±2	9±3	5±2	3±3
	Джорджия	100±6	84±4	26±4	11±1	9±3	4±2
	Луїза	100±6	89±4	28±2	11±3	9±3	5±3
Початок ризогенезу	Е5 Борозан	-	29±4	26±3	22±2	23±2	22±4
	М41 Алекс	27±2	27±3	26±2	19±3	20±3	18±4
	Джорджия	-	-	28±3	24±4	21±4	22±2
	Луїза	-	-	30±3	26±4	23±3	21±3

За використання пагонових експлантів у регенерантів спостерігали ознаки надмірного обводнення тканин. У сорту М41 Алекс 77 % регенерантів були скловидними, а в інших сортів всі регенеранти мали подібну ознаку. У регенерантів без ознак вітрифікації виявлено початкові ознаки ризогенезу: утворення напливу в базальній частині пагону та поява 1-2 кореневих бугорків. Схожі особливості регенерації спостерігалися у рослин *in vitro*, отриманих із 30-денних донорів. У цих варіантах висота пагонів зросла порівняно з 15-денними донорами на 4–14 мм залежно від сорту, досягаючи 24–49 мм. Хоча регенеранти із 30-денних донорів також характеризувалися високим рівнем вітрифікації (63–89 %), у цьому варіанті ризогенез уже відзначали не лише у сорту М41 Алекс, але й у сорту Е5 Борозан.

Припускаємо, що затримка в рості, уповільнення процесів коренеутворення та високий рівень гіпергідратованих регенерантів пов'язані з неповним формуванням бруньок експлантів, ізольованих із 15– та 30-денних донорів. Такий стан може бути зумовлений особливостями синтезу гормонів і анатомічними характеристиками. Зокрема, менш розвиненими провідними системами та незавершеним формуванням клітинних стінок, які характеризуються підвищеною проникністю для води та розчинених у ній солей [27, 31].

Також передбачається, що в молодих бруньках синтезується менша кількість гормонів-інгібіторів та ауксинів, що узгоджується з результатами інших досліджень [29, 97, 104].

Встановлено, що вік донорських рослин суттєво впливає на морфогенез регенерантів *in vitro*. Оптимальним для культивування є вік 60–75 днів, оскільки такі експланти демонстрували найкращі показники росту (висота понад 90 мм), мінімальний рівень скловидності (3–9 %) та найшвидший початок ризогенезу (18–23-й день). Використання молодших (15–30-денних) донорів призводило до значного відсотка скловидних рослин і затримки коренеутворення, що свідчить про їхню підвищену фізіологічну нестабільність у культурі *in vitro*.

5.4. Трофічні детермінанти

Гормональні детермінанти взаємопов'язані з трофічними, що спостерігається, наприклад, у взаємодії нітрогену та цитокінінів. Підвищений вміст нітрогену стимулює активність цитокінінів, які, у свою чергу, прискорюють їх транспортування до клітин та метаболізацію [65, 78, 87, 167]. Дефіцит кальцію ускладнює детермінацію апікального домінування через проблеми з транспортом ауксинів [46, 57, 60, 69, 70].

У контексті живлення, детермінант – це фактор, який визначає або обмежує функцію чи метаболізм. Елементи живлення, відповідно до законів живлення, впливають на фізіологічні процеси рослин. За різних протоколів

мікроклонального живлення, змінюючи кількість та доступність елементів живлення, технолог може свідомо чи випадково впливати на вибір рослиною одного з можливих шляхів онтогенезу.

Проаналізовано вплив середовищ із різним вмістом мінеральних елементів (табл. 5.5) на ризогенез експлантів мигдалю чотирьох сортів. Досліджувалися такі показники: швидкість початку коренеутворення та середня довжина кореневої системи. У дослідженні використовували середовища MS, QL, WPM, NAM, та NRM.

Таблиця 5.5

**Особливості трофічної детермінації ризогенезу регенерантів
мигдалю на етапі мультиплікації**

Біометричний показник/ мінеральна основа	MS	QL	WPM	NAM	NRM
Алекс					
Початок коренеутворення, день	39±3	42±4	45±4	33±3	38±4
Середня довжина кореня на 45 добу спостереження, мм	31±2	4±2	2±3	46±6	35±4
Е5 Борозан					
Початок коренеутворення, день	37±4	32±4	43±4	30±2	36±4
Середня довжина кореня на 45 добу спостереження, мм	37±4	41±44	11±2	49±4	40±3
Луїза					
Початок коренеутворення, день	43±3	45±5	59±5	44±3	49±5
Середня довжина кореня на 45 добу спостереження, мм	11±2	2±1	-	7±2	-
Джорджия					
Початок коренеутворення, день	45±4	44±	66±3	39±3	41±3
Середня довжина кореня на 45 добу спостереження, мм	7±2	2±1	-	13±3	7±2

Найпізніший початок ризогенезу спостерігався на середовищі WPM. Наприклад, у сорту Е5 Борозан корені почали формуватися на 43-й день культивування, а в сорту Джорджия – на 66-й день. Найшвидше коренеутворення спостерігалось на середовищі NAM: від 30 днів у сорту Е5 Борозан до 44 днів у сорту Луїза. Середовищу NAM також притаманні найкращі показники довжини кореневої системи порівняно з іншими варіантами.

Засвоєння та метаболізація як мінеральних елементів, так і екзогенних активних біологічних сполук визначається від концентрації іонів H^+ і OH^- , тобто, від рівня рН середовища [72, 76, 101]. У дослідженні було проаналізовано вплив рН на ризогенез регенерантів сорту Джорджия на середовищах NAM, NRM, QL, MS, та DKW (рис. 5.3.), використовуючи умови з додаванням БАП (0,100 мг/л), ІМК (0,500 мг/л) та вирощування донорів експлантів на безгормональному середовищі MS.

Іони H^+ впливають на активність передачі гормональних сигналів, транспортування гормонів і інших речовин. Рівень рН визначає активацію одних ферментів і гальмування інших, що, у свою чергу, впливає на метаболізм. Метаболічні зміни зумовлюють і морфологічні зміни, зокрема формування адвентивних коренів.

У кислому середовищі (рН 5,4–5,6) засвоєння кальцію рослинами є ускладненим. Це важливо, оскільки кальцій впливає на транспорт метаболітів, ауксинів і активність багатьох ферментів [130, 131, 147, 149, 160].

У наших дослідженнях було встановлено вплив як складу мінеральних елементів у різних рецептурах живильних середовищ, так і рівня рН. Зміни кислотності середовища більш виражено впливали на варіанти, які в попередніх експериментах виявилися менш придатними для мигдалю (MS, DKW). На середовищах NAM і NRM кількість рослин була більшою, а коливання рН – менш значними. Середовище QL за кількістю регенерантів із коренями займало проміжне положення між MS, DKW та NAM, NRM.

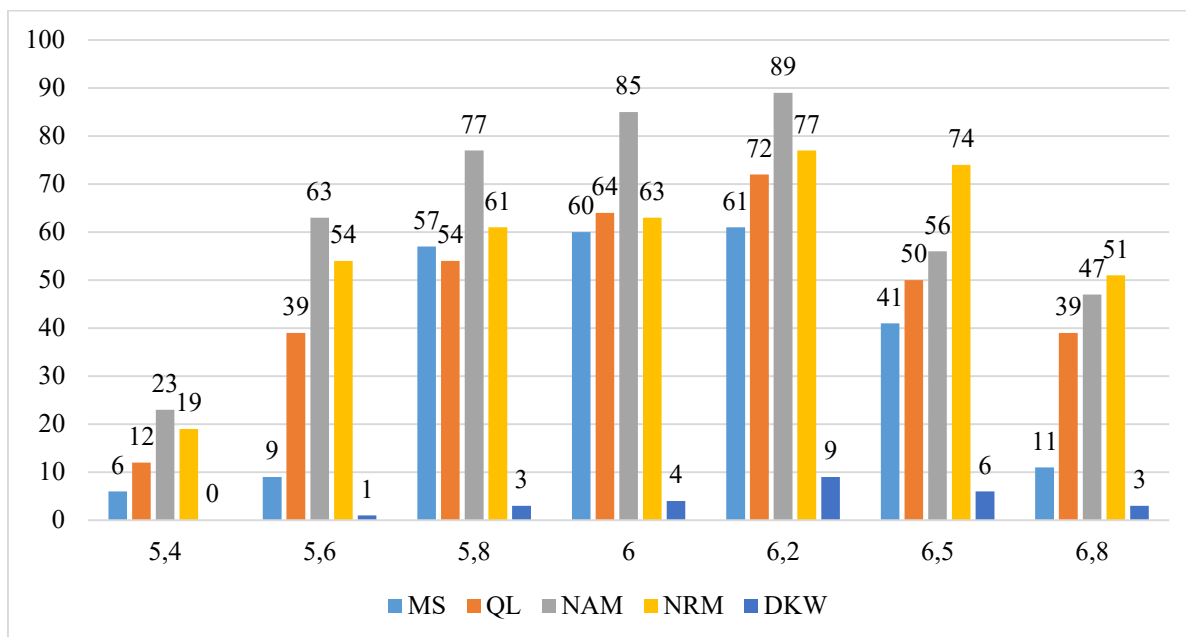


Рис. 5.3. Вплив рівня рН на кількість рослин-регенерантів із коренями мигдалю сорту Джорджія *in vitro* через 45 днів культивування на різних живильних середовищах із додаванням 0,500 мг/л ІМК

Ознаки низького рН проявлялися у вигляді гіпергідратації тканин, надмірного розростання листкових пластинок, почорніння та відмирання верхівок пагонів. У варіантах із підвищеним рН (понад 6,2) спостерігалися труднощі із засвоєнням заліза та магнію.

5.5. Карбонумісні компоненти середовища

Карбон є найпоширенішим органічним елементом у рослинних організмах як за кількістю, так і за вмістом у численних біохімічних молекулах. Він входить до складу первинних і вторинних метаболітів [19, 22, 29], а також виконує структурну та енергетичну функції, будучи компонентом біологічно активних речовин, таких як гормони, ферменти та вітаміни. Його концентрація та різноманітність відіграють ключову роль у визначенні процесів морфогенезу й онтогенезу рослинних об'єктів [55, 65].

У наших дослідженнях було детально проаналізовано вплив різних концентрацій екзогенної сахарози в межах 1–6 % (10–60 г/л), доданої до штучного живильного середовища, на процес регенерації рослин мигдалю

in vitro на третьому етапі мікроклонального розмноження – етапі індукції ризогенезу. Цей етап є критичним для формування кореневої системи у регенерантів, що безпосередньо впливає на їх подальшу життєздатність, адаптацію до умов екзовітру та успішність акліматизації. Зокрема, вивчалось, як різні рівні сахарози впливають на частоту утворення коренів, їх морфологічні характеристики (довжина, кількість, гілкування), а також загальний стан рослинного матеріалу. Отримані результати дозволили визначити оптимальну концентрацію цукру для стимуляції ризогенезу, що є важливим кроком у вдосконаленні протоколів мікроклонального розмноження мигдалю (табл. 5.6).

Таблиця 5.6

Особливості морфогенезу експлантів мигдалю сорту Джорджія під впливом різних концентрацій сахарози в штучному живильному середовищі через 45 днів культивування

Концентрація, %	0 (контроль)	1	2	3	4	5	6
Висота регенерантів, мм	45,4	76,3	86,3	51,2	40,0	36,4	21,6
Довжина листкової пластинки, мм	9,6	6,2	5,7	2,4	1,8	1,5	1,3
Ширина листкової пластинки, мм	39,7	31,4	32,9	44,3	41,6	30,9	26,6
Кількість коренів, шт	2,1	4,0	3,9	2,8	1,4	-	-
Довжина кореневої системи, мм	21,4	49,8	57,6	34,4	12,2	-	-
Регенерантів із інтенсивним калусоутворенням в базальній частині пагону, %	-	-	-	1,3	19,6	43,6	47,9
Регенерантів з ознаками гіпергідратації, %	-	-	2,1	12,9	35,6	71,4	76,8

Було встановлено, що концентрація сахарози в штучному живильному середовищі визначає морфогенез вегетативних органів мигдалю *in vitro* під час регенерації з експлантів, впливаючи на біометричні показники. Висота пагонів зростала зі збільшенням концентрації сахарози до 2 % (20 г/л) порівняно з контролем (без сахарози, автотрофне живлення) [22, 79, 101, 160]. У варіанті з 10 г/л (1 %) висота пагонів становила 76,3 мм проти 45,4 мм у контрольному варіанті. За концентрації 20 г/л пагони досягали 86,3 мм. Подальше

підвищення концентрації сахарози до 3 % і 4 % спричиняло зменшення висоти пагонів і їх потовщення, тоді як у варіантах із 5 % і 6 % спостерігалася розеточність пагонів.

Найбільші розміри листкових пластинок (довжина і ширина) були зафіксовані в контрольному варіанті без додавання сахарози, що пояснюється автотрофним типом живлення рослин. За таких умов листки виконували властиві їм *in vivo* функції фотосинтезу, що стимулювало збільшення площі фотоасимілюючої поверхні. Відсутність екзогенної сахарози і підвищене використання ендогенної сахарози (синтезованої регенерантом) для формування фотоасимілюючих поверхонь призводили до меншого розміру кореневої системи в контрольному варіанті порівняно з варіантами із додаванням сахарози (10, 20 та 30 г/л).

Найдовшу кореневу систему та найбільшу кількість коренів було зафіксовано у варіантах із 1 % та 2 % сахарози. У середньому для варіанту з 10 г/л (1 %) довжина коренів становила 40,8 мм, а кількість коренів – 4,0 шт. на регенерант. У рослин на середовищі з 2 % сахарози довжина кореневої системи становила 57,6 мм при середній кількості коренів 3,9 шт. на рослину. У контрольному варіанті (без сахарози) довжина кореневої системи була 21,4 мм, а кількість коренів – 2,1 шт. на рослину.

Підвищення концентрації екзогенної сахарози в живильному середовищі до 30 г/л і більше спричиняло надмірну обводненість тканин регенерантів. Зокрема, у варіанті з 3 % сахарози гіпергідратація спостерігалася у 12,9 % рослин, тоді як при 60 г/л – у 76,8 %. Як сама сахароза, так і продукти її метаболізму є осмотично активними речовинами [79, 101, 160], що, на нашу думку, і викликає гіпергідратацію.

Високий вміст сахарози (3 % і більше) сприяв утворенню пухких калусних утворень у базальній частині пагонів, що свідчить про інтенсивний ріст та поділ клітин на початкових етапах розвитку рослин. Однак регенеранти з такими калусними утвореннями, при подальшій адаптації після септичної обробки, за умов підвищеної вологості, часто гинули. Це відбувалося через

загнивання калусних тканин, які мали слабо розвинуті оболонки, що не забезпечували належного захисту від впливу навколишнього середовища. Відсутність достатньо міцної клітинної стінки сприяла проникненню патогенів і розвитку процесів гниття, що призводило до загибелі рослин.

Таким чином, для формування розвиненої кореневої системи на етапі індукції ризогенезу найкращими є концентрації сахарози 1 % і 2 %.

Окрім сахарози, було вивчено ефективність додавання до живильного середовища мезоінозиту та активованого або деревного вугілля (див. Додатки). Варіанти з мезоінозитом у концентраціях 100 і 200 мг/л не продемонстрували відмінностей від контрольного варіанту без цієї речовини.

Додавання активованого вугілля в кількостях 1,0 і 1,5 г/л на фоні 2 % сахарози підвищувало середню кількість коренів із 3,9 до 4,3. Натомість більші концентрації (2,0 і 2,5 г/л) виявили фітотоксичний вплив, що проявлялося у зменшенні розмірів рослин і частковій втраті тургору. Заміна активованого вугілля на деревне прискорювала початок ризогенезу на 7,6 дня.

5.6. Світло

Більшість життєвого циклу рослини проводять як автотрофи, тобто формують біомолекули свого тіла завдяки синтезу їх з неорганічних сполук із залучанням світлової енергії. Еволюційно склався зв'язок між кількісним, якісним надходженням світла і онтогенезом рослини [6, 17, 29, 33, 57, 67].

В культурі *in vitro* з міксотрофним живленням з переважанням гетеротрофного роль світла як джерела енергії для біосинтезів незначна. Проте світло відіграє роль детермінанта який зафіксований на рівні геному. Ним регулюються як метаболічні процеси (синтез первинних та вторинних метаболітів), так і морфологічні зміни [19, 22, 152]. Зокрема дія спектру світла може бути близькою до дії фітогормонів. Наприклад, при переважанні червоного (4 до 1) над синім спектром чіткіше проявляється апікальне домінування, що подібно дії ауксинів [29, 148].

Нами досліджено особливості детермінації ризогенезу регенерантів мигдалю (сорт Джорджия) за таких змін світла: 1) інтенсивність освітлення; 2) тривалість освітлення (фотопеїод); спектр співвідношення червоного і синього.

Інтенсивність освітлення впливала на кількісний і якісний характер біохімічних реакцій та морфогенез [56, 62, 111, 122, 150]. Детермінацію регенерації рослин на етапі ризогенезу проводили за такої інтенсивності світлового потоку: 1,2; 1,8; 2,4; 2,9; 3,7; та 4,4 kLux з відхиленням $\pm 0,2$ kLux, що пов'язане із особливостями розміщення культуральних ємностей що до світлоносіїв. Різний за інтенсивністю світловий потік досягався різною кількістю світлодіодів на площі. Встановили відмінності в біометричних показниках регенерантів на 45 день культивування на фоні двох комбінацій гормонів (БАП 0,1 + ІМК 0,25; БАП 0,25 + ІМК 1,0.) за освітлення 16 годин на добу (табл. 5.7).

Таблиця 5.7

Особливості морфогенезу експлантів мигдалю за різної інтенсивності освітлення, сорту Джорджия на 45 день спостережень

Інтенсивність освітлення, kLux	1,2	1,8	2,4	2,9	3,7	4,4
Висота регенерантів, мм	26,4/ 19,1	39,0/ 37,4	101,6/ 54,6	123,2/ 178,6	136,6/ 185,3	137,2/ 196,4
Кількість міжвузлів, шт	3,1/2,6	3,3/3,0	5,7/3,2	5,9/5,7	6,1/6,1	6,0/6,2
Довжина коренів, мм	-	14,7	69,2/57,8	77,4/71,6	91,2/97,6	93,1/99,4
*Кількість коренів, шт.	-	1,9/1,1	2,3/1,6	2,7/3,1	2,7/3,4	3,7/4,4
Регенерантів з коренями, %	-	21,4/11,7	43,1/31,7	68,6/81,6	73,4/89,6	89,6/94,1
Із калусами в основі пагону, %	76/96	61/86	11/54	4/19	0/3	-

**Примітка:* особливості морфогенезу експлантів мигдалю за різної інтенсивності освітлення на фоні двох комбінацій гормонів в чисельнику БАП 0,1 + ІМК 0,25; в знаменнику БАП 0,25 + ІМК 1,0.

Висота регенованих рослин *in vitro* попри наявність сахарози в живильному середовищі залежала від інтенсивності світла. За збільшення інтенсивності світла з 1,2 до 3,7 kLux висота регенерантів збільшувалася. Різниця між варіантами в 3,7 та 4,4 kLux була в межах похибки ($\approx 5\%$). Подібна тенденція встановлена і відносно біометричного показника «кількість міжвузлів».

Серед порівнювальних варіантів краще ризогенез (кількість коренів та їх довжина) був на варіанті із освітленням в 3,7 та 4,4 kLux.

Щодо взаємодії «комбінація гормонів та інтенсивність освітлення» виявлено наступну залежність: на варіантах із меншою інтенсивністю освітлення вищі біометричні показники були з меншим умістом гормонів, а на варіантах 2,8; 3,7 та 4,4 kLux більший пагін та більше розвинута коренева система була за більших концентрацій. Високі концентрації гормонів за нижчого освітленні індукували утворення калусів в базальній частині пагону.

5.7. Фотоперіод

Тривалість світлового дня пов'язана із сезонністю в природі, тобто, чергування теплої та холодної пори року [47]. Відповідно генетично закладено інформацію про особливості онтогенезу, зокрема і морфогенезу, зокрема утворення вегетативних та генеративних органів та їх тканин [7, 29, 49].

За скорочення тривалості світлового періоду переважають процеси розвитку над ростом. Відбувається закладання запасуючих речовин, посилюється формування покривних тканин, прискорюється формування органів, бруньок, але менших розмірів [80, 86, 87, 97, 100, 118, 144].

За інтенсивності освітлення $2,9 \pm 0,2$ kLux нами було досліджено особливості морфогенезу рослин, з акцентом на процес формування коренів (*de novo*), у залежності від тривалості фотоперіоду. Для цього було проаналізовано реакції рослин при п'яти варіантах освітлення: 8, 12, 16, 20 та 24 години на добу. Такий підхід дозволив оцінити вплив тривалості світлового

дня на ефективність ризогенезу та загальний морфофізіологічний стан рослин в умовах *in vitro* (табл.5.8.).

Таблиця 5.8.

Особливості морфогенезу в регенерантів мигдалю *in vitro* за різного фотоперіоду на 45 день спостережень, сорт Джорджія. БАП 0,100, ІМК 0,250 мг/л

Фотоперіод, годин на добу	8	12	16	20	24
Маса регенеранта, г	0,347	0,562	1,237	1,611	1,892
Маса коренів, г	0,094	0,117	0,413	0,502	0,519
Початок ризогенезу	27,2	20,2	20,4	23,6	36,4

Співвідношення маси регенеранту і його маси кореневої системи, незалежно від фотоперіоду, було як три до одного. Початок ризогенезу за періодів від 12 до 24 вповільнювався із 20,2 до 36,4 днів. Тобто, збільшення тривалості освітлення вповільнювало початок періоду утворення коренів. Тобто, процеси росту переважали нар розвитком. Це підтверджується збільшенням маси регенерантів. Також за найкоротшого фотоперіоду в досліді у 8 годин на добу початок коренеутворення наставав пізніше (на 27,2 добу) порівняно із варіантами в 12, 16 і 20 годин на добу. На нашу думку, оптимальним варіантом є фотоперіод в 16 годин на добу [29, 53,75].

Висновки до розділу 5

У результаті дослідження впливу абіотичних та ендогенних факторів на ризогенез і постасептичну адаптацію регенерантів мигдалю *ex vitro* встановлено, що оптимізація умов культивування сприяє підвищенню рівня укорінення та виживаності рослин.

Субстрат є ключовим чинником приживлюваності. Найкращі результати отримано за застосування перліту з підживленням (60,7 %) та кокосового волокна з підживленням (54,6 %). Найефективнішою виявилася комбінація

цих субстратів у співвідношенні 1:1, що забезпечило активний розвиток кореневої системи.

Освітлення відіграє важливу роль у ризогенезі та адаптації. Оптимальними параметрами визначено світлову інтенсивність 4,4 KLux і 16-годинний фотоперіод, що сприяє 81,3 % приживлюваності та стимулює ріст коренів.

Температурно-вологісний режим є критичним для виживаності рослин. Найбільш сприятливими умовами виявилися температура 24 °C та вологість 85 %, що забезпечували 81,6 % приживлюваності. Підвищення температури до 30 °C негативно впливало на регенеранти через інтенсифікацію дихання та втрати органічних речовин.

Ендогенні регулятори росту істотно впливають на ризогенез. Найкращі результати отримано за використання середовища з 0,125 мг/л 6-бензиламінопурину (БАП) і 0,75 мг/л індолілмасляної кислоти (ІМК), що сприяло ефективному укоріненню.

Сортові особливості мають значний вплив на адаптаційний потенціал рослин. Найвищу приживлюваність продемонстрував сорт Алекс (91,5 %), який також мав найдовші корені (136,4 мм). Високу ефективність показав Борозан (89,7 %), тоді як Луїза характеризувалася найбільшою кількістю коренів (8,3 шт.), що вказує на її виражені компенсаторні механізми.

Отримані результати є важливими для вдосконалення методів мікроклонального розмноження мигдалю та можуть бути використані для підвищення ефективності його адаптації *ex vitro*.

За матеріалами досліджень розділу 5 опубліковано 2 наукові праці [75, 76].

РОЗДІЛ 6

ПОСТАСЕПТИЧНА АДАПТАЦІЯ

За для розширення знань при постасептичній адаптації нами досліджено вплив ендо та екзогенних факторів. Це зокрема:

- субстрат;
- вологість повітря;
- температура освітленість;
- вік регенеранта *in vitro*;
- сортові особливості;
- умови вирощування рослин *in vitro*.

Обліковували такі біометричні показники:

- відсоток регенерантів, що прижилися;
- кількість коренів та їх довжина.

6.1 Коренеутворення регенерантів

В постасептичних умовах субстрат впливає на низку показників, які впливають на організацію та життєдіяльність на етапі *ex vitro*:

- рН;
- кількість та доступність елементів живлення;
- аерація;
- уміст води.

30-ти денні регенеранти сорту Джоржія висаджували на такі субстрати:

- Поліський універсальний;
- Еко плюс універсальний;
- Класман К₂;
- Кокосове волокно + підживлення;
- Перліт + підживлення (табл. 6.1).

Таблиця 6.1

**Ризогенез мигдалю *ex vitro* на різних субстратах на 30 день
спостереження, сорт Джорджия**

Субстрат	Поліський універсальний	Есо plus універсальний	Класман К ₂	Кокосове волокно + підживлення	Перліт + підживлення
Приживлюваність, %	4,7	43,1	40,6	54,6	60,7
Приріст коренів, кількість штук	3,6	4,9	4,6	4,1	7,2
Приріст кореневої системи в довжину, мм	31,6	77,4	80,3	79,1	111,9
Приріст пагону у висоту, мм	44,5	58,6	55,4	63,1	57,4

Субстрат Поліський універсальний, Есо plus універсальний, Класман К₂, згідно з даними виробників містили в собі комплекс мінеральних елементів. На елементах із кокосовим волокном та перлітом мінеральне живлення забезпечувалося поливом мінеральної частини (макросолі, мікросолі, розчинами Са та Fe) [65] живильного середовища NAM [132]. Кислотність на початку досліду доводили до рН 6.0 розчином КОН.

Приживлюваність регенерантів на субстраті Поліський універсальний становила 4,7 %, а на решті варіантів від 40 % (Класман К₂) до 60,7 % (Перліт + підживлення). Найбільший приріст кореневої системи в умовах *ex vitro* відмічено на перліті 7,2 шт, на регенерант. На інших варіантах кількість новоутворених коренів становила від 3,6 шт (Поліський універсальний) до 4,9 (Есо plus універсальний). Найдовша коренева система також була за адаптації на перліті 111,9 мм, при найменшій на Поліський універсальний 31,6 мм. На решті варіантів приріст коренів у довжину становив від 77,4 до 80,3 мм.

За приростом фотоасиміляційного апарату (стебло і листки) за виключенням мало відрізнялися між собою. Приріст пагона на цих варіантах становив 55,4 – 63,1 мм. Регенеранти, що росли під час під час адаптації на перліті, мали порівняно з іншими природніх розмірів товстіше стебло та листки насиченого зеленого забарвлення (рис. 6.1).



Рис. 6.1. Регенерант мигдалю під час адаптації на перліті

За результатами проведених обліків, варіант із використанням перліту на етапі постасептичної адаптації виявився найбільш ефективним порівняно з іншими варіантами. Однак після пересадки рослин у більші ємності, наприклад із касети в горщик об'ємом Р 9 (0,5 л), коренева система рослин, вирощених на перліті, порівняно з іншими варіантами, розросталася значно повільніше. Це свідчить про те, що перліт, хоча й сприяє початковому коренеутворенню, може не бути оптимальним для подальшого розвитку кореневої системи в більш просторих умовах.

У зв'язку з цим, ми випробувати поєднання перліту і кокосового волокна в різних співвідношеннях: 1 : 1, 2 : 1, 1 : 2. Це дозволяє дослідити можливість поліпшення розвитку кореневої системи в більших ємностях, де важливе значення має структура середовища для оптимального росту коренів. Кокосове волокно завдяки своїм властивостям може покращити аерацію і водопоглинання, що має позитивний вплив на кореневу систему, а також забезпечити краще утримання вологи в порівнянні з чистим перлітом. Тому

поєднання цих компонентів може створити більш сприятливі умови для розвитку рослин в умовах постасептичної адаптації (рис. 6.2).

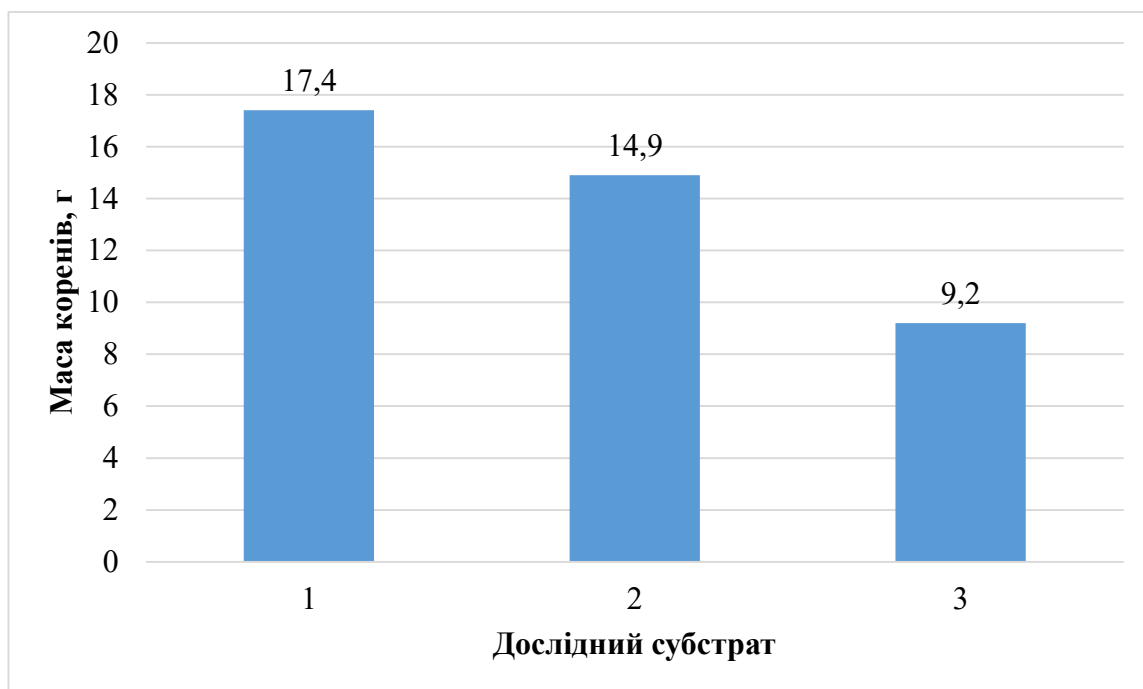


Рис. 6.2. Маса коренів мигдалю через місяць після перевалки із касет Р 9, сорт Джорджия (1 – співвідношення 1 : 1; 2 – співвідношення 2 : 1; 3 – співвідношення 1 : 2)

Встановили, що серед порівнювальних варіантів найбільша маса коренів (17,4) була за додавання обох субстратів в співвідношенні об'ємів 1 : 1.

За збільшенням умісту одного з компонентів поживної суміші спостерігалось зменшення маси кореневої системи. Така тенденція свідчить про чутливість процесу ризогенезу до змін у хімічному складі середовища, зокрема до надлишку окремих елементів, які можуть пригнічувати ріст коренів або порушувати їх нормальний розвиток [10].

Вважаємо, що із збільшенням умісту кокосового волокна через високу його вологоємність зменшувалася його аерація. А у випадку із збільшеним вмістом перліту корені повільно поширювалися за межі первинного об'єму (об'єм комірки касети).

6.2. Вплив світла на ризогенез під час постасептичної адаптації

При перенесенні рослин *in vitro* у відкритий ґрунт світло є єдиним джерелом енергії, за незначним виключенням запасних поживних речовин які регенерант відклав *in vitro*. Тобто, відбувається лише автотрофний спосіб живлення.

Завдяки надходженню води, мінеральних елементів та, що особливо важливо, доступності кисню відбувається перетворення пластичних речовин, які надходять від фотоасимілюючих органів в тканини кореневої системи. Нами досліджено на сорті Джоржія вплив інтенсивного освітлення за фотоперіоді в 16 годин на добу та вплив різної тривалості освітлення на добу (фотоперіод) [29]: 8; 12; 16; 24 години на добу (табл. 6.2).

Таблиця 6.2

Вплив інтенсивності освітлення на стан регенерантів мигдалю *ex vitro* під час постасептичної адаптації сорту Джорджія

Інтенсивність освітлення, КЛух	0,8	1,7	2,3	3,1	4,4	5,6
Приріст пагону у висоту, мм	7,1	12,4	21,0	67,8	72,6	70,9
Приріст кореня в довжину, мм	-	4,2	19,6	86,7	97,3	106,0
Кількість коренів,шт	0,3	1,8	2,1	4,4	8,1	9,9
Приживлюваність, %	6,4	11,2	44,5	73,6	81,3	81,9

Встановили, що інтенсивність освітлення в 2,3 КЛух і менше на етапі адаптації втрачали більшість половин рослин *in vitro*. У таких рослин були майже відсутні прирости як фотоасиміляційного апарату, так і кореневої системи.

Вважаємо, що причиною цього є перевантаження процесів дихання над фотосинтезом при недостатньому освітленні.

Технологічно прийнятою, на нашу думку, є інтенсивність серед досліджуваних варіантів в 3,1 КЛух. Так при освітленні в 3,1 КЛух

приживлюваність становила 73,6 %. На варіантах із іншим освітленням в 4,4 і 5,6 Клук приживлюваність зростала відповідно 81,3 та 81,9 %.

Тобто, між собою ці варіанти відрізнялися незначно (при похибці 5 %). Таку закономірність встановлено і по показнику «приріст кореня в довжину» 97,3 та 106,0 мм відповідно.

Отже, розвиток регенерантів за інтенсивності освітлення в 4,4 та 5,6 Клук є однаковим із точки зору економії. Доцільно використовувати 4,4 Клук.

Реакція рослинного організму протягом еволюції заклалася генетично, адже протягом вегетації тривалість світлового дня була пов'язана із іншими факторами, наприклад сезонністю. Відповідно, відповіддю на довжину світлового дня (фотоперіод) є різка реакція метаболічних процесів і, як їх наслідок, морфологічні зміни. Так, скорочення світлового дня стимулює відкладання запасуючих та покривних тканин при зменшенні вегетативних органів в тому числі і кореня. Порівнюючи ростові процеси регенерантів за різного фотоперіоду, встановили біометричні відмінності (табл. 6.3).

Таблиця 6.3

**Вплив фотоперіоду на ріст регенерантів при постасептичній
адаптації сорту Джорджія**

Фотоперіод / годин	8	12	16 (контроль)	24
Приріст пагона, мм	32,4	59,6	73,1	94,2
Приріст кореневої системи в довжину, мм	46,8	63,7	95,6	116,3
Приріст в кількості коренів, шт.	2,3	3,1	8,0	8,2
Приживлюваність, %	69,4	74,1	82,2	89,8

За результатами проведених досліджень встановили, що подовження фотоперіоду сприяє покращенню росту пагонів і кореневої системи, а також збільшенню приживлюваності регенерантів сорту Джорджія. Найкращих результатів досягнуто при 24-годинному освітленні, хоча і 16-годинний фотоперіод забезпечує високі показники росту і адаптації, що може слугувати для покращення процесів культивування [75].

6.3. Вплив вологості повітря та температури повітря на успішність адаптації рослин *in vitro*

Для характеристики швидкості ферментативних реакцій застосовують коефіцієнт Q_{10} [19]. Який вказує в скільки раз зростає швидкість реакції за зростання температури на 10°C .

Нами досліджено вплив температури на приживлюваність регенерантів за трьох інтенсивностей освітлення:

- 2,3 Klux;
- 4,4 Klux;
- 5,6 Klux (рис. 6.3).

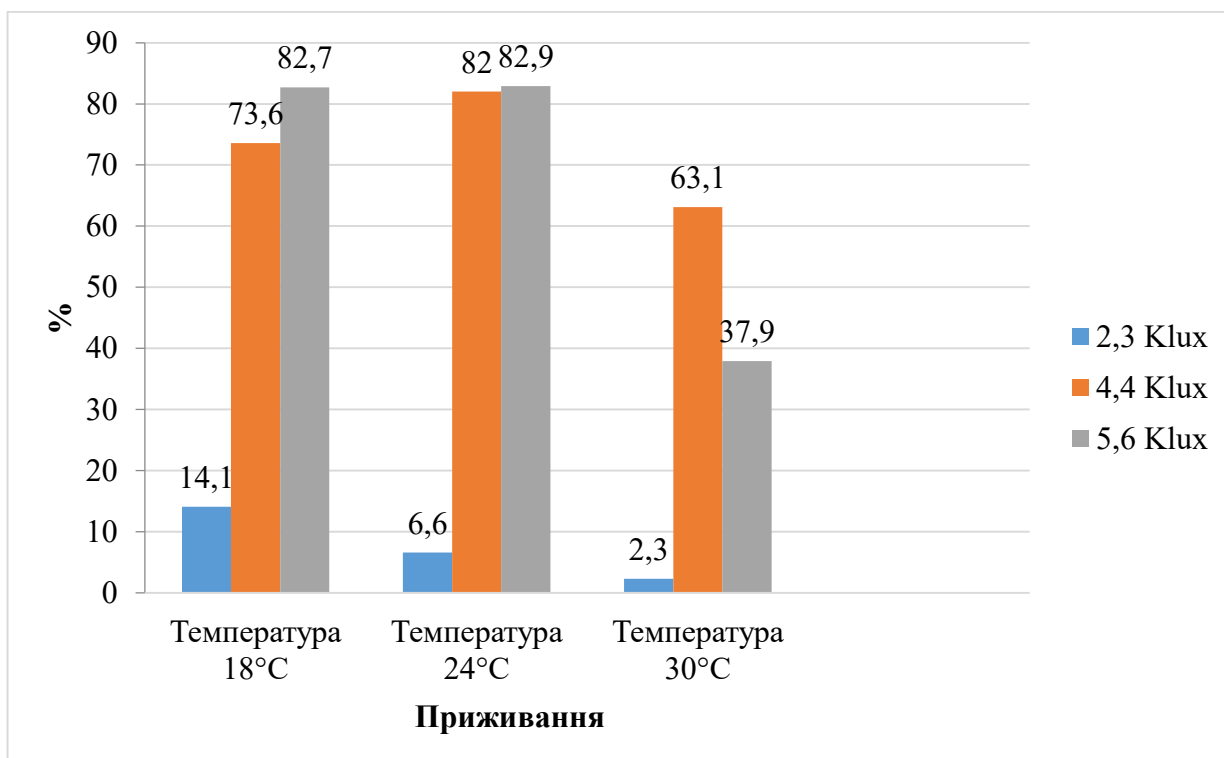


Рис. 6.3. Вплив температури і світла на приживлюваність регенерантів, сорту Джорджія

Встановили найвищий показник приживання за температури 24°C при освітленні 4.4 і 5.6 Klux 82,0 та 82,9 % відповідно. Зростання температури повітря за недостатнього освітлення (2.2 Klux) зумовило зменшення кількості регенерантів до 2,3 % при 30°C . За вищих температур на нашу думку зростає дисиміляція (дихання) без істотного зростання фотоасиміляції. Таким чином

відбувається втрата органічних речовин на дихання із низьким відсотком їх перетворення в конституційні метаболіти.

Зростання вологості за високих температур сприяє інтенсифікації сапрофітної, патогенної мікрофлори в тому числі термофільних бактерій які протягом 1-2 діб мацерують тканини ніжних тканин *in vitro* [29, 65, 140, 147].

За різного поєднання вологості та температури повітря приживання регенерантів на етапі постасептичної адаптації була різною. (рис.6.4.)

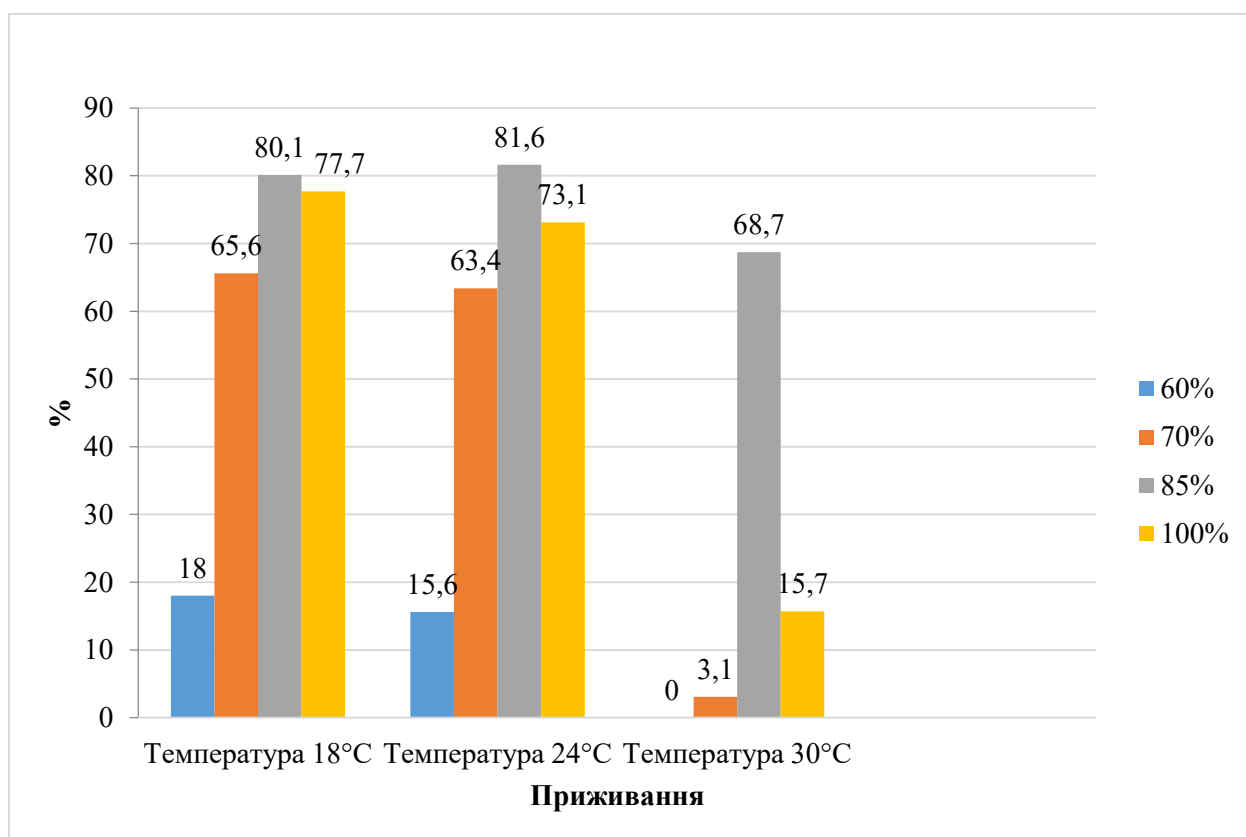


Рис. 6.4. Приживання регенерантів на етапі постасептичної адаптації за різного поєднання вологості та температури

Встановили, оптимальними умовами для приживання регенерантів є температура 24 °С та вологість 85 %, що забезпечує найвищий рівень приживання (81,6 %). Зниження температури до 18°C також сприяє високому приживанню (80,1 %), тоді як підвищення до 30°C значно погіршує адаптацію регенерантів (68,7 % за вологості 85 %). За зниженої вологості (60–70%) приживаність стабільна лише при температурі 18 °С, тоді як при 30 °С вона

різко падає. Максимальна вологість (100 %) сприяє адаптації при низьких і помірних температурах, але малоефективна за високих температур.

6.4. Ендогенні детермінанти

Життєдіяльність рослинного об'єкта (від клітини до цілого організму) відбувається реалізацією генетичної програми. На її швидкість і «якість» реалізації впливають зовнішні умови [113, 121, 161]. У клітинах, тканинах змінюється уміст ендогенних детермінант та їх активність.

Вплив комплексу ендогенних факторів дослідили за такими змінами:

- регенеранти вирощені на середовищах з різним умістом синтетичних гормонів;
- різні за віком регенеранти;
- сортові особливості.

Оцінювали показники приживлюваності та прирости вегетативних органів при постасептичній адаптації.

Екзо та ендогенні гормони детермінують розвиток регенерантів згідно правила Скуга-Міллера [29, 80, 86, 87, 97, 100, 101, 102, 128, 131, 132, 133, 159].

При надлишку цитокінінів відбувається гілкування пагону, а при переважанні ауксинів відбувається апікальне домінування верхівкової бруньки пагону та ризогенез.

Гормони накопичившись в материнській рослині передаються потомству під час живцювання [55]. Нами порівняно приживлюваність регенерантів та приріст їх вегетативних органів за різного попереднього вирощування *in vitro* на таких варіантах середовищ:

- БАП 0,125, ІМК 0,75 мл/л;
- БАП 0,75, ІМК 0,125 мл/л;
- БАП 0,125, ІМК 0,125 мл/л (рис. 6.5).

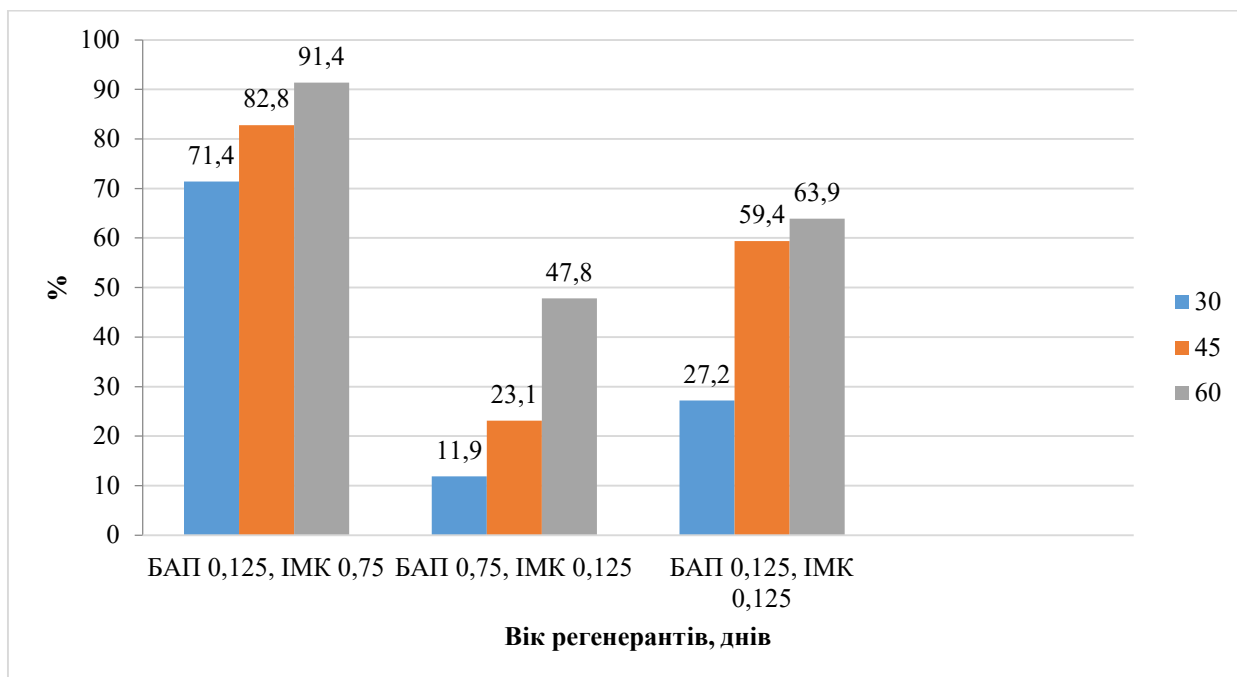


Рис. 6.5. Приживлюваність регенерантів та приріст їх вегетативних органів за різного попереднього вирощування *in vitro* на різних варіантах середовищ

Встановили, що оптимальним поєднанням зовнішніх факторів (температура, вологість) та внутрішніх (ендогенні гормони, генотип) дозволяє суттєво підвищити ефективність адаптації та розвитку регенерантів *in vitro*. Сорт Алекс є найперспективнішим для подальшого культивування, а використання синтетичних гормонів у концентраціях БАП 0,125 мл/л і ІМК 0,75 мл/л забезпечує найкращі результати.

Синтез ендогенних детермінант залежить від обміну речовин, в тому числі синтезу вторинних метаболітів. Своєю чергою, метаболізм залежить від детермінант в тому числі речовин із гормональною активністю. Тобто, є взаємозалежність. Вона також залежить від генотипу та умов навколишнього середовища [69, 88, 152].

На чотирьох сортах встановлено відмінності у приживлюваності та прирості їх вегетативних органів (рис. 6.6).

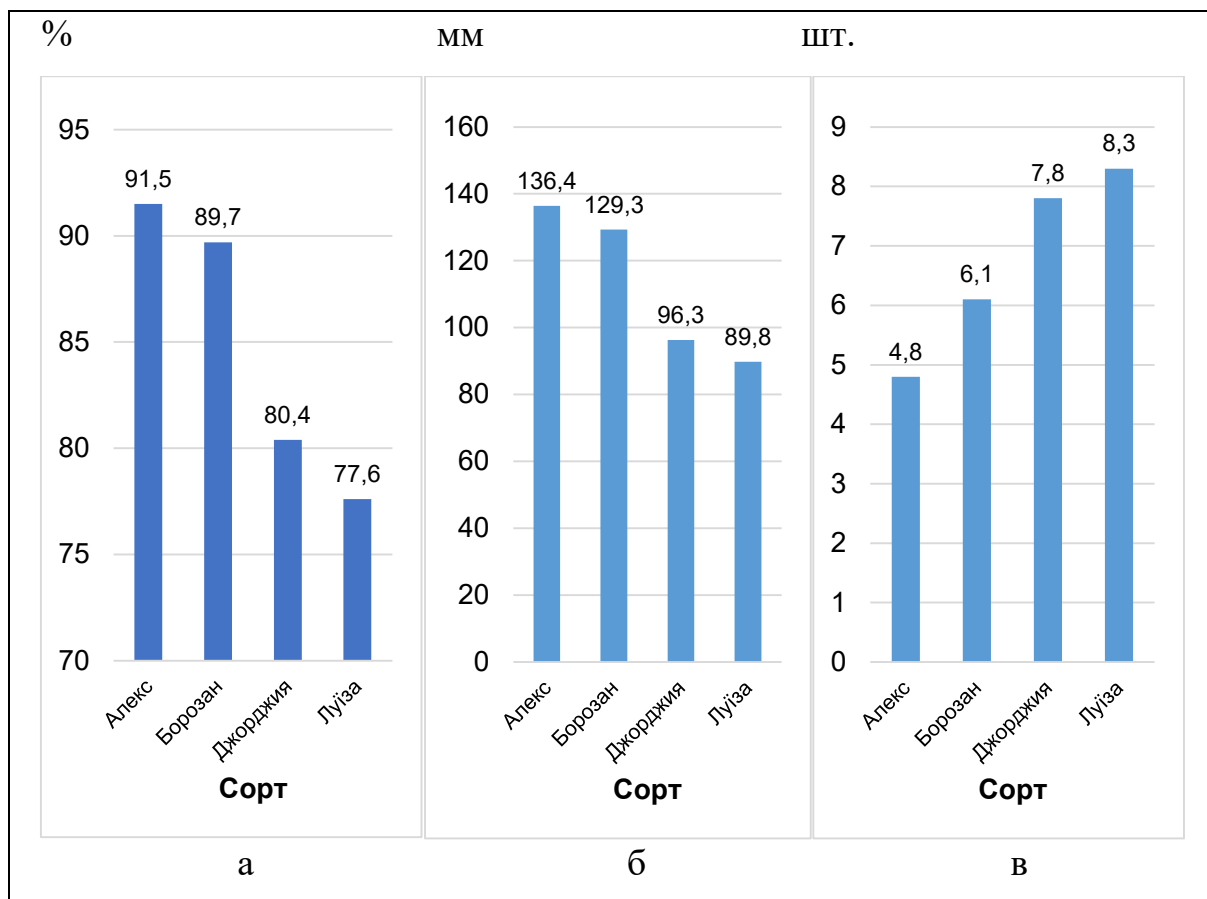


Рис 6.6. Вплив сорту на приживлюваність (а), приріст кореня в довжину (б) та приріст кількості коренів (в) при постасептичній адаптації регенерантів *in vitro* мигдалю

Встановили, що сорт Алекс є найперспективнішим для адаптації *in vitro* завдяки максимальній приживлюваності (91,5 %) та приросту коренів у довжину (136,4 мм). Сорти Борозан і Джорджия також мають хороші показники, зокрема Борозан проявляє високу стійкість у стресових умовах. Сорт Луїза, незважаючи на найнижчу приживлюваність (77,6 %), показує максимальну кількість коренів (8,3 шт.), що свідчить про його компенсаторні механізми.

Для успішної адаптації регенерантів рекомендовано підтримувати температуру 22–24 °С, вологість 75–85 %, та світловий режим 16 годин світла і 8 годин темряви. Це забезпечує оптимальний ріст і знижує ризик стресу.

Висновки до розділу 6

У результаті досліджень встановлено, що успішність постасептичної адаптації регенерантів мигдалю *ex vitro* визначається комплексною взаємодією ендогенних та екзогенних факторів. Оптимальними умовами для приживлюваності рослин є температура 22–24 °С, вологість 75–85 % та інтенсивність освітлення 4,4 KLux при фотоперіоді 16 годин.

Виявлено, що субстрат впливає на ризогенез, причому найкращі результати отримані при використанні перліту з підживленням (60,7 % приживлюваності, 111,9 мм приросту коренів).

Подовження фотоперіоду до 24 годин сприяє максимальному росту пагонів і кореневої системи, однак 16-годинний режим є економічно доцільним. Генетичні особливості також відіграють важливу роль: сорт Алекс продемонстрував найвищу приживлюваність (91,5 %) і приріст коренів (136,4 мм), тоді як сорт Луїза, попри нижчу приживлюваність, характеризувався максимальною кількістю новоутворених коренів.

Збалансоване поєднання зовнішніх умов та ендогенних регуляторів дозволяє значно підвищити ефективність адаптації та подальшого культивування регенерантів *in vitro*.

За матеріалами досліджень розділу VI опубліковано одну наукову працю [74].

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено теоретичне підґрунтя та запропоновано новий підхід до розв'язання наукової проблеми, що полягало у визначенні фізіолого-біохімічних, анатомо-морфологічних особливостей, які проявились у процесі культивування *in vitro*, та оптимізації технологічного процесу культивування видів рослин *Prunus dulcis in vitro, ex vitro*.

1. Визначено, що успішність мікроклонального розмноження мигдалю суттєво мірою залежить від взаємодії ендогенних і екзогенних факторів, які впливають на морфогенез, ризогенез та постасептичну адаптацію рослин.

2. Встановлено оптимальні умови для ефективної деконтамінації експлантів мигдалю. Найвищий рівень асептичності (94–98 %) досягнуто при використанні меристем та пагонів проростків. Найефективнішим стерилізуючим агентом виявився Бланідас 300, який забезпечив 88–93 % деконтамінації та максимальну морфогенну активність експлантів (63–78 %).

3. Визначено, що найбільш сприятливими для морфогенезу є експланти, ізольовані навесні під час природного пробудження бруньок ($E_1 = 83\text{--}93\%$; $E_m = 47\text{--}70\%$). Введення експлантів у культуру в період глибокого спокою спричиняло значне зниження рівня деконтамінації (3–9%) і відсутність морфогенезу.

4. Встановлено, що середовище MS сприяє калусоутворенню, проте отримані калуси мали низьку морфогенну активність і піддавалися вітрифікації. Оптимальним середовищем для індукції морфогенних калусів визначено NAM із додаванням 1,0 мг/л БАП, 2,0 мг/л кінетину та 2,0 мг/л аденінсульфату, що забезпечувало морфогенез у 28–38 % експлантів. Додавання гіберелової кислоти (1,0–2,0 мг/л) сприяло підвищенню рівня морфогенезу до 73–94 %.

5. Виявлено, що походження експлантів суттєво впливає на онтогенез регенерантів. Для формування пагонів рекомендовано використовувати

верхівки пагонів із вегетативними бруньками. Використання маточних рослин віком менше 90 днів як донорів експлантів є недоцільним.

6. Встановлено, що вибір живильного середовища має критичне значення для ефективності мультиплікації. Для мигдалю оптимальним є середовище – NAM із додаванням 1,0 мг/л бензиламінопурину та 0,1 мг/л індолілмасляної кислоти.

7. Виявлено, що оптимальними є сахароза в концентрації 30 г/л або її поєднання з сорбітом у співвідношенні 25 г/л сахарози та 5 г/л сорбіту [112]. Встановлено, що додавання 0,25 мг/л БАП у поєднанні з 0,75 мг/л кінетину сприяє збільшенню кількості мікропагонів, покращенню росту пагонів і зменшенню відсотка вітрифікованих рослин.

8. Виявлено, що періодичне введення донорських рослин у стан спокою є ефективним заходом для підтримки тривалого і стабільного пасажування мигдалю *in vitro*.

9. Встановлено, що стратегія мікроклонального розмноження мигдалю передбачає утворення розетки пагонів із верхівкової бруньки шляхом індукції. Поділ пагонів на одно- чи двовузлові живці визнано технологічно недоцільним.

10. Визначено, що успішність постасептичної адаптації регенерантів *ex vitro* залежить від комплексної взаємодії температурно-вологісного режиму, освітлення та субстрату. Найбільш сприятливими умовами є температура 22–24 °С, вологість 75–85 % та інтенсивність освітлення 4,4 KLux при 16-годинному фотоперіоді.

11. Дослідження впливу субстрату на ризогенез підтвердило, що найкращі результати отримані при використанні перліту з підживленням (60,7% приживлюваності, приріст коренів 111,9 мм). Найефективнішою виявилася комбінація перліту та кокосового волокна у співвідношенні 1:1.

12. Встановлено, що сортові особливості суттєво впливають на адаптаційний потенціал рослин. Найвищу приживлюваність (91,5 %) і максимальний приріст кореневої системи (136,4 мм) продемонстрував сорт

Алекс. Сорт Луїза, попри нижчу загальну приживлюваність, характеризувався найбільшою кількістю коренів (8,3 шт.), що свідчить про його високу компенсаторну здатність.

РЕКОМЕНДАЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

(Протокол технології мікроклонального розмноження)

Рослини є відкритими біологічними системами, що здатні до саморегуляції, саморозвитку та самовідтворення [29].

Взаємодіючи з навколишнім природним середовищем, вони змінюють свій обмін речовин і енергії, а також зазнають морфологічних змін, зокрема в будові кореня та покривних тканин. Ці процеси відбуваються завдяки експресії певних генів, притаманних генотипам конкретних рослинних об'єктів [1.28, 88].

У класичних біотехнологічних підходах середовище навколо дослідної культури змінюється двічі:

- 1) під час переведення в асептичні умови;
- 2) на етапі адаптації (четвертий етап мікроклонального розмноження).

Солодкий мигдаль (*Prunus dulcis*) є важливою з господарської точки зору горіхоплідною культурою. Водночас, з погляду ботаніки він належить до кісточкових культур роду *Prunus* (Слива), який вналежить до підродини мигдалевих (*Amygdaloideae*) або сливових (*Prunoideae*) родини розових (*Rosaceae*). У зв'язку з цим традиційно використовувані середовища для горіхоплідних культур, зокрема DKW, не є оптимальними для культивування мигдалю *in vitro*.

Аналогічно й поживні середовища QL та MS, ефективні для інших представників роду *Prunus*, не створюють сприятливих умов для росту мигдалю. Це пов'язано з його природною адаптацією до ареалів з бідними на поживні речовини ґрунтами, зокрема, з низьким вмістом нітрогену, а також із вираженою кальцієфільністю цієї культури.

Турецькі вчені Nas M. та Read P. [1.131, 132] висунули гіпотезу, що оптимальне середовище для культури тканин рослин має бути подібним за складом до хімічного складу сім'ядолей [145]. На основі цієї гіпотези були розроблені спеціалізовані середовища: NAM рекомендовано для культивування мигдалю; NRM призначено для вирощування фундука.

У процесі МКР основним поживним середовищем пропонується використовувати модифіковане середовище NAM (табл. 1). Для запобігання накопиченню фітотоксичних ефектів та підтримки життєздатності рослинних культур рекомендується періодично, після кожних 5–7 пасажів, використовувати так звані «розвантажувальні» середовища – модифіковані QL або NRM.

Таблиця 1

**Склад основного та розвантажувального середовищ для
мікроклонального розмноження мигдалю**

Компонент	Уміст в 1 л середовища	
	QL _{mod}	NAM _{mod}
NH ₄ NO ₃	400,00	900,00
KNO ₃	1800,00	250,00
KH ₂ PO ₄	270,00	1550,00
MgSO ₄ ×7H ₂ O	360,00	2050,00
Ca(NO ₃) ₂ ×4H ₂ O	833,80	1050,00
CaCl ₂ ×2H ₂ O	–	45,00
FeSO ₄ ×7H ₂ O	27,800	–
Na ₂ ЕДТА×2H ₂ O	37,30	–
Ferrilene 4.8 Orto-Orto	–	114,63
MnSO ₄ ×4H ₂ O	0,76	6,00
H ₃ BO ₃	6,20	11,00
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	8,60	11,0
CuSO ₄ ×5H ₂ O	0,025	3,20
	0,25	
Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O	–	0,10
CoCl×6H ₂ O	0,025	–
KJ	0,08	–
ВАР	1,5 введення, 1,0 мультиплікація і 0,3 ризогенез	
ІВА	0,2 введення, 0,3 мультиплікація і 1.5 ризогенез	
Вітамін В ₁	1,00	
Вітамін В ₆	0,60	
Вітамін РР	1,00	
Вітамін С	3,00	
Мезо-інозитол	100,00	
Гліцин	1,00	
Сахароза	30×10 ³	

Описано специфіку приготування концентрованих розчинів мінеральних компонентів поживного середовища в (табл. 2.) Інші розчини є однокомпонентними та готуються за співвідношенням 1 мг на 1 мл (1:1).

Таблиця 2

**Підготовка маточних розчинів мінерального складу середовища
NAM (Nas Almond Medium)**

Компонент		кількість	
		мг/л готового середовища	г/л в 1 л маточного розчину
Макросолі (1:40)			
1	NH ₄ NO ₃	900	36,0
2	KNO ₃	250	10,0
3	KH ₂ PO ₄	1550	62,0
4	MgSO ₄ ×7H ₂ O	2050	82,0
Ca (1:100)			
1	Ca (NO ₃) ₂ ×4H ₂ O	1050	105,00
2	CaCl ₂ ×2H ₂ O	45	4,5
Мікросолі (1:1000)			
1	H ₃ BO ₃	11,0	11,0
2	CuSO ₄ ×5H ₂ O	3,2	3,2
3	MnSO ₄ ×H ₂ O	6,0	6,0
4	NaMoO ₄ ×2H ₂ O	0,1	0,1
5	ZnSO ₄ ×7H ₂ O	11,0	11,0
Хелат заліза			
1	Ferrilene 4,8 Orto-Orto	114,63	9,17

Представлена таблиця демонструє склад мінерального поживного середовища з розподілом компонентів за групами макро- і мікроелементів, а також джерел кальцію та заліза. Макроелементи, розведені у співвідношенні 1:40, включають основні поживні солі, такі як NH₄NO₃, KNO₃, KH₂PO₄ та MgSO₄×7H₂O, які забезпечують азот, фосфор, калій і магній у концентраціях, необхідних для підтримки росту рослин. Кальцій подається окремо у формі Ca(NO₃)₂×4H₂O та CaCl₂×2H₂O з розведенням 1 : 100, що дозволяє точно контролювати його рівень. Мікроелементи, введені з розведенням 1 : 1000,

містять бор, мідь, марганець, молібден та цинк, які є критично важливими для метаболічних процесів. Хелат заліза представлений у формі Ferrilene 4,8 Orto-Orto у концентрації 114,63 мг/л, що забезпечує стабільне постачання заліза у доступній для рослин формі. Така структура складу свідчить про збалансований підхід до формування живильного середовища, орієнтованого на підтримку оптимального росту та розвитку рослин.

Для отримання робочого розчину компоненти додаються відповідно до (табл. 3.)

Таблиця 3

**Застосування маточних розчинів для підготовки середовища NAM
(Nas Almond Medium)**

Компонент	На 1 літр	На 4 літри
Макросолі NAM	25.00	100,00
Мікросолі NAM	1,00	4,00
Кальцій NAM	10,00	40,00
Ferrilene 4.8 Orto-Orto	12,5	50,00
B ₁	0,5	2,0
B ₆	0,3	1,2
Нікотинова кислота (PP)	3,0	12,0
Аскорбінова кислота	1,5	6,0
Гліцин (глютамін)	1,0	4,0
Аденін	0,5	2,0
Кінетин	1,0	4,0
БАП *м/р	0,2/0,1	0,8/0,4
ІОК *м/р	0,25/1,0	1,0/4,0
ІМК *м/р	0,25/0,5	1,0/2,0
Інозитол	0,1 г	0,4 г
Агар	7,0г	28,000г
Цукор	30.000	120,000
pH 5,8–6,0		

**Примітка:* скороченню м/р відповідає мультиплікація/ризогенезу

Для стимулювання ризогенезу змінюють співвідношення цитокинінів та ауксинів у напрямку підвищення концентрації ауксинів згідно з рекомендаціями, наведеними в (табл. 1) (з урахуванням правила Скуга-Міллера).

Процес акліматизації проводять на субстраті, що складається з кокосового волокна та перліту у співвідношенні 1 : 1, у вологій камері [142].

Застосування первинних експлантів *in vitro* може призводити до появи розетковості та гіпергідратації регенерантів (рис. 1). Починаючи з 3–5 пасажу, експланти поступово втрачають морфогенетичний потенціал.



Рис. 1. Початкова стадія патології мигдалю характеризується вкороченням пагону (розеточністю) та гіпергідратацією

У випадку виявлення подібної патології експланти та уражені регенеранти зазвичай переносять на живильне середовище з мінімальною концентрацією цитокінінів (0,1 мг/л) та зменшеним удвічі вмістом мінеральних речовин.

У контексті впровадження рослинного матеріалу в стерильні умови *in vitro*, фундаментальним етапом є первинна ініціація експлантів, яка може бути реалізована шляхом двох альтернативних стратегій: шляхом селекції фітосанітарно безпечних, вірусологічно чистих донорських рослин серед маточних форм, або через мікрохірургічну екстракцію апікальних або меристемних структур з подальшим культивуванням у контрольованому середовищі. Такий підхід дозволяє мінімізувати ризики контамінації та забезпечити високий рівень морфогенетичної стабільності у подальшому процесі мікроклонального розмноження.

За матеріалами досліджень розділу 7 опубліковано одну наукову працю [65].

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Адаменко Т. І. Агрокліматичне зонування території України з врахуванням зміни клімату. Київ, 2014. 20 с.
2. Агрономічні принципи вирощування кісточкових культур. URL: <https://www.yara.ua/crop-nutrition/fruits/stone-fruits/stone-fruit-key-facts/agronomic-principles/> (дата звернення: 03.02.2023).
3. Антагонізм та синергізм: взаємодія елементів живлення у рослині. URL: <https://dobrodiy.in.ua/statti/antagonizm-ta-synergizm-vzayemodiya-elementiv-zhyvlennya-u-roslyni/>. (дата звернення: 23.07.2023).
4. Булавін І.В. Ризогенез у культурі *in vitro Arabidopsis thaliana* дикого типу та *scr* мутанта. *Укр. Бот. журн.* 2014, Вип. 71. № 1. С. 78–82. URL: <https://ukrbotj.co.ua/pdf/71/1/ukrbotj-2014-71-1-078.pdf>
5. Варлащенко Л.Г. Агробіологічні та технологічні особливості кореневласного розмноження жимолості їстівної в умовах Правобережного Лісостепу України : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. с.-г. наук: 06.01.07. Умань, 2001. 18 с.
6. Веденичова Н.П., Косаківська І.В. Цитокиніни як регулятори онтогенезу рослин за різних умов зростання. Київ : Наш формат, 2017. 200 с.
7. Власенко М.Ю., Вельямінова-Зернова Л.Д., Мацкевич В.В. Фізіологія рослин з основами біотехнології: Підручник. Біла Церква: БДАУ, 2006. 504 с.
8. Геноміка : навч. посіб. Попов В.М., Долгова Т.А. Лиманська С.В. та ін. Харків : ХНАУ, 2020. 104 с.
9. Деконтамінація. URL: <https://uk.wikipedia.org/wiki/Деконтамінація>. (дата звернення: 03.10.2021).
10. Дубецька М. Мигдаль : відновлення потужних коренів. Садівництво. Виноградарство. № 3. 2020. С. 90–92.
11. Іващенко І.С., Козаченко І.В. Вплив стимуляторів росту на коренеутворення під час вегетативного розмноження *Thuja plicata* Don. *Науковий вісник НЛТУ України*. 2013. Вип. 26, № 3. С. 101–105.

12. Інструкція щодо використання засобу дезінфікуючого «Бланідас 300 (Blanidas 300)» з метою дезінфекції об'єктів. Київ, 2017. URL: <https://lysoform.shop/wp-content/uploads/2020/07/instrukczya-blanidas-300-blanidas-300-1.pdf>. (дата звернення: 23.07.2022).

13. Києнко З.Б. Кімейчук І.В., Мацкевич В.В. Мікроклональне розмноження рослин роду *Actinidia* Lindl. *Plant Varieties Studying and Protection*, 2022. Т. 18, № 3. С. 196–205.

14. Кліматичні зміни та їх вплив на сфери економіки України : монографія / Степаненко С. М. та ін. / За ред. С.М. Степаненка, А.М. Польового. Одеса : Вид. «ТЕС», 2015. 520 с.

15. Коли цвітуть мигдалеві сади. Реалії та перспективи розвитку промислових мигдалевих садів в Україні : науково-практичний семінар. URL: <https://osau.edu.ua/naukovo-praktychnyj-seminar-koly-tsvitut-mygdalevi-sady-realiyi-ta-perspektyvy-rozvytku-promyslovyh-mygdalevyh-sadiv-v-ukrayini/>. (дата звернення: 23.09.2021).

16. Корсак К.В., Плахотнік О.В. Основи сучасної екології : навч. посіб. 4- те вид., перероб. і допов. К., МАУП, 2004. 340 с.

17. Коць С. Я. Веденичова Н. П., Косаківська І. В. Цитокініни як регулятори онтогенезу рослин за різних умов зростання. К.: Наш формат, 2018. 200 с.

18. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. К., Логос, 2005. 730 с.

19. Кушнір Г.П., Сарнацька В.В. Мікроклональне розмноження рослин. Теорія і практика. К., Наук. думка, 2005. 270 с.

20. Лозовіцький П.С. Основи землеробства та рослинництва. Книга 2. Рослинництво. Посібник для вищих учбових закладів. К., 2010, 268 с.

21. Мацкевич В.В., Підгаєцький О.О. Особливості використання форми та кількості заліза за вирощування *in vitro* ожини і малини. *Вісник Сумського національного аграрного університету: науковий журнал. Агрономія і*

біологія. Сумський національний аграрний університет. Суми : СНАУ, 2015. Вип. 9 (30). С. 46–51.

22. Мацкевич В.В. Мікроклональне розмноження видів рослин *in vitro* та їх постасептична адаптація. Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису : дис. д-ра с.-г. наук : 06.01.05. Суми, 2020. 478 с.

23. Мацкевич В.В. Удосконалені методи оздоровлення картоплі від вірусів та використання отриманого матеріалу в первинному насінництві. Дисертація за спеціальністю 06.01.14 – насінництво. Київ, 2004. 153 с.

24. Мацкевич В.В., Кімейчук І.В., Мацкевич О.В., Шита О.П. Світовий досвід, перспективи в Україні розмноження фундука та мигдалю. *Агробіологія*. 2022. № 1. С. 179–191. URL: <https://ukrbotj.co.ua/pdf/71/1/ukrbotj-2014-71-1-078.pdf>.

25. Мельник О., Довгун І. Властивості модифікованого крохмалю. *Ukrainian food journal*. 2013. - Vol. 2, no. 3, С. 354-359.

26. Мацкевич В.В., Роговський С.В., Власенко М.Ю., Черняк В.М. Основи біотехнології рослин : навчальний посібник. Біла Церква : Білоцерківський національний аграрний університет, 2010. 135 с.

27. Мацкевич В.В., Філіпова Л.М. Гіпергідратація *in vitro* та її чинники. Наукові пошуки молоді в третьому тисячолітті. Тези доповідей Міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених, аспірантів і докторантів БНАУ, Біла Церква, 19–20 травня 2016 року. С. 31.

28. Мацкевич В.В., Філіпова Л.М., Кравченко Н.В., Подгаєцький А.А. Проблеми постасептичної адаптації рослин. *Abstracts of the 7th International scientific and practical conference «Dynamics of the development of world science»* (March 18–20, 2020). Perfect Publishing, Vancouver, Canada. 2020. P. 662–674.

29. Мацкевич В.В., Філіпова Л.М., Олешко О.Г. Фізіологія і біотехнологія рослин : підручник. Біла Церква : БНАУ, 2022. 427 с.

30. Мацкевич Н.О., Пустовіт О.С., Власенко М.Ю. Мацкевич В.В. Особливості індивідуального розвитку картоплі при клональному

мікророзмножені. *Вісник Білоцерківського державного аграрного університету*. 2007. Вип. 46. С. 27–31.

31. Мацкевич О. В., Андрієвський В. В., Філіпова Л. М. Вплив 6-бензиламінопурино на гіпергідратацію регенерантів *Rubus fruticosus* L. та *Rubus idaeus* L. Тези доповідей IV Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія : звершення та надії. 2015. Київ. С. 143–144.

32. Мацкевич О.В., Кімейчук І.В., Мацкевич В.В. Карпук Л.М. Мікроклональне розмноження фундука. *Вісник Уманського національного університету садівництва*. № 1, 2022. Серія 203 «Садівництво і виноградарство». С. 106–115.

33. Мацкевич О.В., Кімейчук І.В., Мацкевич В.В., Павліченко А.А. Трофічні та фітогормональні детермінанти онтогенезу *in vitro*. *Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія «Агрономія і біологія»* Вип. 2 (48), 2022. С. 111–123.

34. Мацкевич О.В., Лісовий М.М. Біотехнологія : звершення та надії присвячена до 120-річчя НУБіП України. Матеріали VI Міжнародної науково-практичної конференції. 2017 р. Київ. 316 с.

35. Мацкевич О.В., Філіпова Л.М., Мацкевич В.В., Андрієвський В.В. Павловнія : науково-практичний посібник. Біла Церква, БНАУ, 2019. 80 с.

36. Медведєва Т., Васюта С. Щоб оздоровити. *Інститут садівництва НААН України. Журнал «Садівництво по-українськи»*. 2015. URL: <https://agrotimes.ua/article/shchob-ozdoroviti/>. (дата звернення: 23.07.2023).

37. Мигдаль плодовий смачний та корисний горіх. URL: <https://ilovesad.com/myhdal-plodovyj-solodkyj-posadka-vyroshchuvannia-ta-dohliad/> (дата звернення: 22.10.2022).

38. На півдні України з'являться сади мигдалю української селекції. URL: <https://kurkul.com/news/22365-na-pivdni-ukrayini-zyavlyatsya-sadi-migdalju-ukrayinskoyi-selektsiyi> (дата звернення: 23.09.2021).

39. Наталчук Т.А., Медведєва Т.В., Запольський Я.С., Барбан О.Б. Особливості впровадження в культуру *in vitro* вишні сорту «Ксенія» та вишні сорту «Василиса прекрасна». Вивчення та охорона сортів рослин. Вип 16 (1). 2020. С. 97–102. URL: <https://doi.org/10.21498/2518-1017.16.1.2020.201353>.
40. Опалко А.І., Опалко О.А. Використання методів біотехнології. Селекція плодових і овочевих культур: навч. посіб. для студ. вищ. навч. закл. : Ч. 1. Загальні основи селекції городніх рослин / за ред. А.І. Опалка. Умань : НДП «Софіївка» НАН України, 2012. С. 201–233.
41. Охорона прав на сорти рослин : бюлетень. Український інститут експертизи сортів. Вінниця : ТОВ «ТВОРИ», 2020. Вип. 5. 395 с.
42. Пінчук Н.В., Коваленко Т.М., Вергелес П.М. Садово-паркова фітопатологія: навч. посіб. / за ред. Н.В. Пінчук. Вінниця : ВНАУ. 2020. 380 с.
43. Подгаєцький А.А., Мацкевич В.В., Врублевський А.Т. Використання біоциду РРМ як додаткового деконтамінанта в процесі мікроклонального розмноження рослинних об'єктів. *Вісник Сумського національного аграрного університету: науковий журнал. Агрономія і біологія*. Суми : СНАУ. 2016. Вип. 9 (32). С. 159–163.
44. Подгаєцький А.А., Мацкевич В.В., Подгаєцький А.А. Особливості мікроклонального розмноження видів рослин : монографія. Біла Церква : Білоцерківський національний аграрний університет, 2018. 209 с.
45. Подгаєцький А.А., Мацкевич В.В., Філіпова Л. М, Кравченко Н.В., Гнітецький М. О. Адаптивність рослин на етапі *in vitro-ex vitro*. *East European Science Journal*. 2020. Vol. 4. No. 56. Part 2. P. 662-674.
46. Подгаєцький А.А., Мацкевич В.В., Філіпова Л.М., Скрипченко Н.В., Кравченко Н.В. Трофічні та гормональні детермінанти онтогенезу *Actinidia chinensis var, deliciosa* (a.Chev.) *in vitro* на етапі мультиплікації. *East European Scientific Journal*. 2020. Vol. 10. No. 62. Part 1. P. 17–24.
47. Примах І.Д., Єзерковська Л.В., Федорук Ю.В., Караульна В.М., Покотило І.А., Панченко О.Б., Хахула В.С., Федорук Н.М., Ображій С.В., Присяжнюк Н.М., Лозінська Т.П., Войтовик М.В., Панченко Т.В., Карпук

Л.М., Павліченко А.А., Панченко І.А. / За ред. І.Д. Примака. Землеробство : Підручник. Вінниця : ГОВ «ТВОРИ», 2020. 578 с.

48. Регулятор росту рослин ГІББ ПЛЮС (GIBB PLUS) (ГЛОБАЛХЕМ Н.В.). URL: <https://superagronom.com/pesticidi-regulyatori-rostu/gibb-plyus-gibb-plus-id9185>. (дата звернення: 03.02.2022).

49. Скляр В.Г. Екологічна фізіологія рослин : підручник. Суми : Університетська книга, 2015. 271 с.

50. Скрипченко Н.В., Мацкевич В.В., Філіпова Л.М., Кибенко І.І. Особливості мікроклонального розмноження представників роду *Actinidia*. Інтродукція рослин. Київ : Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка, 2017. № 1. С. 88–96.

51. Стадник А.П., Мацкевич В.В., Філіпова Л.М., Пасічник Т.В. Деконтамінація та первинне культивування експлантів *Agapanthus* sp. *Агроекологічний журнал*. 2015. № 2. С. 106–112.

52. Стадник А.П., Філіпова Л.М., Мацкевич В.В. Екологічні особливості трофічної та гормональної детермінації ризогенезу *in vitro* регенерантів хости. *Агроекологічний журнал : науково-теоретичний журнал*, № 3. Київ : Ін-т агроекології та біотехнології, Ін-т сіл. госп. мікробіології, 2014. С. 75–80.

53. Терек О.І., Пацула О.І. Ріст і розвиток рослин : навч. посібник. Львів : ЛНУ імені Івана Франка, 2011. 328 с.

54. Філіпова Л., Мацкевич В. Утворення регенерантами фенолподібних речовин під час перших субкультивувань залежно від умов та виду рослин. *Вісник Львівського національного аграрного університету. Агрономія*. 2013. №17(2). С.233–239.

55. Філіпова Л.М., Мацкевич В.В., Карпук Л.М., Павліченко А.А. Особливості засвоєння макроелементів на кислому ґрунті. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції Аграрна освіта та наука : досягнення, роль, фактори росту «Інноваційні технології в агрономії, землеустрої, лісовому та садово-парковому господарстві». БНАУ, 2021. С. 16–18.

56. Філіпова Л.М., Мацкевич В.В., Мацкевич О.В. Перспективи розмноження мигдалю *in vitro*. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції Аграрна освіта та наука : досягнення, роль, фактори росту «Інноваційні технології в агрономії, землеустрої, лісовому та садово-парковому господарстві». БНАУ, 2020. С. 26–28.

57. Філіпова Л.М., Мацкевич В.В., Шита О.П. Трофічні детермінанти онтогенезу регенерантів мигдалю *in vitro*. Генетика і селекція в сучасному агрокомплексі. Матеріали VI всеукраїнської науково-практичної конференції / [Редкол.: О. О. Непочатенко (відп. ред.) та ін. Умань, 2021. 228 с.

58. Хлорид ртуті (II) (ртуть (II) хлориста). URL: <https://systopt.ub.ua/goods/view/17153365/all/hlorid-rtuti-ii-rtut-ii-hlorista/> (дата звернення: 03.04.2022).

59. Шита О.П. Детермінанти розмноження *Prunus dulcis* (mill.) D.a.webb. біотехнологічними методами *Агробіологія*. 2022. № 2. С. 137–152. URL: https://agrobiologiya.btsau.edu.ua/sites/default/files/visnyky/agrobiologiya/shita_2_2022.pdf.

60. Шита О.П. Вплив фітогормональних та трофічних детермінантів на культивування мигдалю в умовах *in vitro*. Актуальні проблеми, шляхи та перспективи розвитку ландшафтної архітектури, садово-паркового господарства, урбоекології та фітомеліорації: матеріали II Міжнародної науково-практичної конференції (Біла Церква, 29 вересня 2022 р.). Біла Церква : БНАУ, 2022. 157 с.

61. Шита О.П. Розробка протоколу отримання асептичної культури *Prunus dulcis* (Mill.) D.A.Webb. *Агробіологія*. 2023. № 1. С. 157–168. URL: https://agrobiologiya.btsau.edu.ua/sites/default/files/visnyky/agrobiologiya/shyta_1_2023.pdf

62. Шита О.П. Детермінація онтогенезу первинних експлантів *Prunus dulcis* (Mill.) D.A.Webb за непрямого морфогенезу. *Аграрна освіта і наука: досягнення та перспективи розвитку : матеріали IV Міжнародної науково-*

практичної конференції (Біла Церква, 30 березня 2023 р.). Біла Церква : БНАУ, 2023. 285 с.

63. Шита О.П., Мацкевич В.В., Філіпова Л.М. Вплив живильного середовища на отруєння продуктами окислення фенолподібних речовин. XVIII International Scientific and Practical Conference «Theories of world science and technology implementation», May 08-10, Osaka, Japan, 2023. Р. 10–12.

64. Шита О.П., Мацкевич В.В. Деконтамінація первинних експлантів *Prunus dulcis* (Mill.) D.A.Webb. Сучасний стан, проблеми і перспективи лісівничої освіти, науки та виробництва: матеріали III Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції (Біла Церква, 14 квітня 2023 р.). Біла Церква : БНАУ, 2023. 171 с.

65. Мацкевич В.В., Кравченко Н.В., Подгаєцький А.А., Мацкевич О.В., Шита О.П., Гнітецький М.О. Мікроклональне розмноження рослин : навчально-методичний посібник Суми. СНАУ. 2023. 216 с. URL: <http://rep.btsau.edu.ua/handle/BNAU/9275>.

66. Шита О.П., Філіпова Л.М., Мацкевич В.В. Особливості загальної стратегії живцювання мигдалю *in vitro*. IV Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «Сучасні виклики і актуальні проблеми лісівничої освіти, науки та виробництва». БНАУ, 2024. С. 122–124.

67. Шита О.П., Філіпова Л.М., Мацкевич В.В. Особливості мультиплікації *in vitro* кісточкових культур. *Агробіологія*. 2024. № 1. С. 222–236. URL: https://agrobiologiya.btsau.edu.ua/sites/default/files/visnyky/agrobiologiya/shita_1_2024.pdf

68. Шита О., Філіпова Л., Мацкевич В. Удосконалений протокол мікроклонального розмноження *Prunus Dulcis* (MILL.) D.A.WEBB. Collection of Scientific Papers «ΛΟΓΟΣ», (May 26, 2023, Boston, USA). Р. 127–130.

69. Шита О.П., Філіпова Л.М., Мацкевич В.В. Детермінанти онтогенезу *Prunus dulcis in vitro*. Актуальні проблеми, шляхи та перспективи розвитку ландшафтної архітектури, садово-паркового господарства, урбоекології та

фітомеліорації: матеріали міжнародної науково-практичної конференції (Біла Церква, 16–17 вересня 2021 р.). Біла Церква : БНАУ, 2021. 122 с.

70. Шита О.П., Кімейчук І.В., Мацкевич В.В. Детермінанти росту й розвитку мигдалю *in vitro*. Сучасний стан та перспективи розвитку науки, освіти та суспільства : збірник тез доповідей міжнародної науково-практичної конференції. Полтава : ЦФЕНД, 15 серпня 2022. 55 с.

71. Domestos : щовін робить і як працює. URL: <https://www.domestos.ua/zdorovya-ta-hihiena/vykorystannya-i-fakty-domestos.html> (дата звернення: 03.02.2022).

72. Filipova L., Shyta O., Matskevych V. Effect of medium acidity on rhizogenesis of sweet almond (*Prunus dulcis* (Mill.) D.a.webb) *in vitro*. Матеріали V Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції (Біла Церква, 18 квітня 2025 р.). Біла Церква : БНАУ, 2025. С. 95-97.

73. Filipova, L., Matskevych, V. Improvement of the elements of technology of micropropagation *Cornus mas* L. *Агробіологія : зб-к наук. праць*. Біла Церква: БНАУ, 2017. № 2 (135). С. 11–16.

74. Shyta O., Filipova L., Matskevych V. Influence of endogenous determinants on the adaptation of almond plants *in vitro*. *Ресурсозберігаючі технології вирощування культурних рослин: матеріали I Міжнародної науково-практичної конференції*. (Біла Церква, 20 березня 2025 р.). Біла Церква: БНАУ, 2025. С. 39-42.

75. Shyta O., Filipova L., Matskevych V. Influence of light on the determination of rhizogenesis of almond plants *in vitro*. *Аграрна освіта і наука: досягнення та перспективи розвитку : матеріали VI Міжнародної науково-практичної конференції* (Біла Церква, 27 березня 2025 р.). Біла Церква: БНАУ, 2025. С. 100-103.

76. Filipova L, Matskevych V, Karpuk L,, Andriievsky V, Vrublevsky A, Pavlichenko A. Krupa N. Features of Pavlovnia plants post-septic adaptation // Book of Abstract of Multidisciplinary Conference for Young Researchers. Bila Tserkva National Agrarian University. 22 November, 2019. - P. 50-53.

77. Aabood, S. (2005). Propagation of Almond (*Amygdalus communis* L.). Plant by Tissue Culture. *Rafidain Journal of Science*. Vol. 16. No 14. P. 100–112.
78. Ahmad, P., Prasad, M.N.V. (2011). Environmental Adaptations and Stress: Tolerance of Plants in the Era of Climate Change. New York: Springer, 515 p.
79. Ahmad, T., N.A. Abbasi, I.A. Hafiz, Ali A. (2007). Comparison of sucrose and sorbitol as main carbon energy sources in micropropagation. *Pak. J. Bot.* Vol. 39. P. 1269–1275.
80. Ainsley, P.J., Collins, G.G., & Sedgley, M. (2000). Adventitious shoot regeneration from leaf explants of almond (*Prunus dulcis* Mill.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, Vol. 36. No. 6. P. 470–474.
81. Ainsley, P.J., Collins, G.G. and Sedgley, M. (2001). *In vitro* rooting of almond (*Prunus dulcis* Mill.). *In vitro Cellular and Developmental Biology. Plant*. Vol. 37. P. 778–785.
82. Ak, B.E., Kıyar, P.K., Hatipoglu, I.H., Dikmetaş B. (2021) Effects of different BA and IBA concentrations on proliferation and rooting of ‘GARNEM’ rootstock *in vitro* propagation. *Intl J Agr Environ Food Sci*. Vol. 5. No. 4. P. 470–476. URL: <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/1818475>
83. Antonelli, M. (1990). Regeneration from almond cotyledons: induction of proembryonal masses. *in vitro Culture*, XXIII IHC 300. P 255–260.
84. Arab, M.M., Yadollahi, A., Shojaeiyan, A., Shokri, S., & Ghoghah, S.M. (2014). Effects of nutrient media, different cytokinin types and their concentrations on in vitro multiplication of G×N15 (hybrid of almond× peach) vegetative rootstock. *Journal of genetic engineering and biotechnology*. Vol. 12. No. 2. P. 81–87.
85. Aydın, E., Demirsoy, H., Yarılgac, T. (2020). *In vitro* propagation in different media of some cherry genotypes as candidate rootstocks for cherry. *XXX International Horticultural Congress IHC2018 : II International Symposium on Micropropagation and in vitro Techniques*. URL: https://www.actahort.org/books/1285/1285_25.htm

86. Bourrain, L. (2018). *In vitro* propagation of *Actinidia melanandra* Franch. and *Actinidia rubricaulis* Dunn. from shoot tip explants. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. Vol. 46. No. 2. P. 162–173. URL: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01140671.2017.1360369>
87. Caboche, M. (1987). Nitrogen, carbohydrate and zinc requirements for the efficient induction of shoot morphogenesis from protoplast-derived colonies of *Nicotiana glauca*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Vol. 8. P. 197–206.
88. Caboni, E., Lauri, P. (2001). Micropropagation as a tool to evaluate response to limiting conditions in almond genotypes. *In : III International Symposium on Pistachios and Almonds*. 591. P. 341–344.
89. Cavallaro, V., Pellegrino, A., Muleo, R., Forgione, I. (2022). Light and plant growth regulators on *in vitro* proliferation. *Plants*. Vol. 11. No. 7. URL: <https://www.mdpi.com/2223-7747/11/7/844>
90. Chaiane, R.G., Idemir, C., Marisa De Cacia, O., Silvia, S., Pertille, R.H., Santos, E.P. (2020). Culture media and BAP concentrations in the embryo culture of ‘BRS Kampai’ peach. Vol. 42. No. 6. P. 1–10. URL: <https://doi.org/10.1590/0100-29452020661>.
91. Chanuntapipat, C., Sedgley, M. and Collins, G. (2003). Micropropagation of almond cultivars Nonpareil and Ne Plus Ultra and the hybrid rootstock Titan × Nemaguard. *Scientia Horticulturae*. Vol. 98. P. 473–484.
92. Driver, J.A., Kuniyuki, A.H. (1984). *In vitro* Propagation of Paradox walnut Rootstock. *Hort Science*. Vol. 19. No. 4. P. 507-509.
93. Druart, P., Gruselle, R. (1986). Plum (*Prunus domestica*). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 1. No. 1. P. 130–154.
94. Druart, P. (2013). Micropropagation of *Prunus* species relevant to cherry fruit production. Protocols for micropropagation of selected economically-important horticultural plants. *Methods in Molecular Biology* (MIMB), Vol. 994. P. 119–136. URL: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-62703-074-8_9

95. Ebrahimi, M., Habashi, A.A., Emadpour, M. et al. (2022). Recovery of virus-free Almond (*Prunus dulcis*) cultivars by somatic embryogenesis from meristem undergone thermotherapy. *Sci Rep*, Vol. 12. No. 14948. URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19269-3>.
96. Ekinçi, H., Saskin, N., Ak, B.E., Dogan, B.D. (2024). Effects of different healing agents on acclimatization success of *in vitro* rooted Garnem (*Prunus dulcis* × *Prunus persica*) rootstock. *Vitro Cell Dev Biol Plant*. Vol. 60. P. 309–317. URL: <file:///C:/Users/Dell3750/Desktop/s11627-024-10420-5.pdf>
97. Ekinçi, H., Şaşkın N., Ak B.E., Doğan B.D. (2024). The effect of different cytokinin hormones on the shoot propagation performance of Garnem and GF-677 rootstocks under in vitro conditions. In : Yücel B, Seydoşoğlu S (eds) *Conference Proceedings Book 14th Intl Conf Agric Anim Sci & Rural Dev*. P. 527–539. URL: <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/4138504>
98. Filipova, L., Matskevych, V. Improvement of the elements of technology of micropropagation *Cornus mas* L. *Агробіологія : зб-к наук. праць*. Біла Церква : БНАУ, 2017. № 2 (135). С. 11–16.
99. Gaba, V.P. (2005). PGRs in plant tissue culture and development. In: Trigano, R.N., Gray, D.J. (eds) *Plant, tissue culture and development*. CRC Press, Boca Raton. P. 87–100. URL: https://www.researchgate.net/publication/328842146_Plant_Growth_Regulators_in_Plant_Tissue_Culture_and_Development
100. Gentile, A., Frattarelli, A., Nota, P., Condello, E. Caboni, E. (2017). The aromatic cytokinin *meta*-topolin promotes *in vitro* propagation, shoot quality and micrografting in *Corylus colurna*L. Vol. 128. P. 693–703.
101. Gürel, S., Gülşen, Y. (1998). The effects of different sucrose, agar and pH levels on *in vitro* shoot production of almond (*Amygdalus communis* L.). *Turkish Journal of Botany*. Vol. 22. No. 6. P. 363–374.
102. Gurel, S., Gulsen, Y. (1998). The effects of IBA and BAP on *in vitro* shoot production of almond (*Amygdalus communis* L.). *Turkish Journal of Botany*. Vol. 22. P. 375–379.

103. Imani, A., Abdollahi, H. (2006). *In vitro* clonal propagation of *prunus persica* L. × *prunus amygdalus* Batsch hybrid. *Acta Hortic.* Vol. 726. P. 179–182. URL: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.726.27>.
104. Ipek, M., Arıkan, S., Eşitken, A., Ara, S. (2023). Effect of different hormones concentration on *in vitro* regeneration of apricot cultivars. *Turk J Agric Food Sci Tech* Vol. 11. No. 8. P.1372–1379. URL: <https://doi.org/10.24925/turjaf.v11i8.1372-1379.6194>.
105. Isikalan, C., Akbas, F., Namli, S., Tilkat, E., Davut, B. (2008). *In vitro* micropropagation of almond (*Amygdalus communis* L. cv. Nonpareil). *African Journal of Biotechnology*, Vol. 7. No. 12. P.1881–1885. URL: <https://academicjournals.org/journal/AJB/article-full-text-pdf/60F585D7282>
106. Isikalan, Ç., Namli, S., Akbas, F.A., Ak B. E. (2011) Micrografting of almond (*Amygdalus communis*) cultivar ‘Nonpareil. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 5. No. 1. P. 61-65.
107. İsikalan C., Akbaş F., Namlı S., Başaran D. (2010). Adventitious shoot development from leaf and stem explants of *Amygdalus communis* L. cv. Yaltinski *Plant Omics Journal*, Vol. 3. No. 3. P. 92–96. URL: https://www.pomics.com/isikalan_3_3_2010_92_96.pdf
108. Jakab-Ilyefalvi, Z., Pamfil, D., Clapa, D., Fira, A. (2008). *In vitro* regeneration and meristem culture of *Prunus domestica* C.V. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. *Horticulture*. Vol. 65. No. 1. P. 126– 131.
109. Kamali, K. (1995). Determination of the most suitable culture medium and growth conditions for micropropagation of Gf677 (hybrid of almond × peach) rootstocks. *M.Sc. Thesis, Tarbiat Modares University*. Vol. 17. No 3. P. 234–243. URL: <https://doi.org/10.22092/SPIJ.2017.110871>.
110. Kester, D.E., Liu, F., Fenton, C.A.L. and Durzan, D.J. (1986). Almond *Prunus dulcis* (Miller) D.A. Webb. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 15. No. 2. P. 414–430.

111. Kester, D.E., Tabachnik, L. and Negueroles, J. (1977). Use of micropropagation and tissue culture to investigate genetic disorders in almond cultivars. *Acta Hortic.* Vol. 78. P. 95–102.
112. Kim H., Farauh M., Cohen Y., Crisosto C., Sadka A., Blumwald E. Non-climacteric ripening and sorbitol homeostasis in plum fruits // *Plant Science*. 2015. Vol. 231. P. 30–39. URL: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.11.002>.
113. Koaym, W., Twaklna, M., AlMattar, E. (2022). Application of plant tissue culture technique to micropropagation of the most important almond cultivars in Syria. *Journal of Genetic and Environmental Resources Conservation*. Vol. 10, no. 3, 225–234.
114. Kouacheur, K., Cherif, H., Bensouici, C., Saidi, F. (2023). *Prunus amygdalus* var. amara (bitter almond) seed oil : fatty acid composition, physicochemical parameters, enzyme inhibitory activity, antioxidant and anti-inflammatory potential. Vol. 17. P. 371–384
115. Lan, P., Li, W., Fischer, R. (2006). Arabidopsis thaliana wild type, phol, and pho² mutant plants different responses to exogenous cytokinins. *Plant Physiol. Biochem.* Vol. 44. P. 343–350.
116. Liu, C., Feng, C., Peng, W., Hao, J., Wang, J., Pan, J., et al. (2020). Chromosome-level draft genome of a diploid plum (*Prunus salicina*). Vol. 9. No. 12. 130 p. URL: <https://academic.oup.com/gigascience/article/9/12/giaa130/6029397>
117. Livari, B.V., Soghadi, Z.S. (2006). *In vitro* rooting of hybrid almond rootstock GF-677 (*Prunus dulcis* x *Prunus persica*). *Acta Horticulturae*, Vol. 726. P. 171–178. URL: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.726.26>.
118. Lloyd G., McCown B. (1980). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot-tip culture. *Proceedings of the International Plant Propagators' Society*. Vol. 30. P. 421–427.
119. Loberant, B., Altman, A. (2003). Micropropagation of plants. In: Flickinger MC (ed) *Encyclopedia of industrial biotechnology : bioprocess,*

bioseparation, and cell technology. Wiley. P. 3499–3515. URL: https://ouci.dntb.gov.ua/en/works/lx3KdXN4/?utm_source=chatgpt.com

120. Mahmoud, K. Ben, Najar, A., Jemai, N., Jemmali, A. (2017). Advances in sanitation methods for fruit tree species through *in vitro* technologies : Possibilities and limits. *JNS AgriBiotech*. Vol. 45. No. 4. P. 2483–2495. URL: https://www.researchgate.net/publication/320694910_Advances_in_sanitation_methods_for_fruit_tree_species_through_in_vitro_technologies_Possibilities_and_limits.

121. Martins, M., Sarmiento, D., Oliveira, M.M. (2004). Genetic stability of micropropagated almond plantlets, as assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant cell reports*. Vol. 23. No 7. P. 492–496.

122. Matskevych, V., Yukhnovskyi, V., Kimeichuk I., Matskevych, O, Shyta, O. (2022). Peculiarities of determining the morphogenesis of plants *Corylus avellana* L. and *Prunus dulcis* (Mill.) D.A.Webb. *in vitro* culture. *Folia Forestalia Polonica, Series A – Forestry*. Vol. 65 no 1, 1–14.

123. Mehra, A., & Mehra, P.N. (1974). Organogenesis and Plantlet Formation *In vitro* in Almond. *Botanical Gazette*, Vol. 135. No 1. P. 61–73.

124. Miguel, C.M., P. Duarte, and M.M. Oliveira. (1996). Shoot regeneration from adventitious buds induced on juvenile and adult almond (*Prunus dulcis* Mill.) explants. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* Vol. 32. P. 148–153.

125. Milbury, P.E., Chen, C.Y.; Dolnikowski, G.G., Blumberg, J.B. Determination of flavonoids and phenolics and their distribution in almonds. *J. Agric. Food Chem.* 2006. Vol. 54. P. 5027–5033.

126. Muna, A.S., Ahmad, A.K., Mahmoud, K. and Abdul Rahman, K., (1999). *In vitro* propagation of semi dwarfing cherry rootstock. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. Vol. 59. P. 203–208.

127. Muna, S., Beura, S., & Patra, S. K. (2016). Standardization of media mixture for hardening of *in vitro* plantlets of *Dendrobium* cv. Sonia-17. *Agricultural Science Digest*. Vol. 35. No. 1. P. 78–80.

128. Murashige, T. and Skoog, F.A (1962). Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Plant Physiology*. Vol. 15. P. 473-497. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
129. Martins, M., Sarmiento, D., Oliveira, M.M. (2004). Genetic stability of micropropagated almond plantlets, as assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant cell reports*. Vol. 23. No. 7. P. 492–496.
130. Namli, S., Isikalan, C., Akbas, F. & Basaran, D. (2011). Improved *in vitro* rooting of almond (*Amygdalus communis*) cultivar ‘Nonpareil’. *Plant Omics*. Vol. 4. No. 1. P. 14–18.
131. Nas, M.N. & Read, P.E. (2001). Micropropagation of hybrid hazelnut: medium composition, physical state and iron source affect shoot morphogenesis, multiplication and explant vitality. *Acta Hort*. Vol. 556. P.251–258.
132. Nas, M.N. & Read, P.E. (2004). A hypothesis for the development of a defined tissue culture medium of higher plants and micropropagation of hazelnuts. *Scientia Hortic*. Vol. 101. P. 189–200.
133. Nas, M.N., Yüksel, B. & Sevgin, N. (2013). Shortcut to long-distance developing of a tissue culture medium: micropropagation of mature almond cultivars as a case study. *Turkish Journal of Botany*. Vol. 37. No. 6. P. 1134–1144.
134. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). (2002). *Consensus document on the biology of Prunus sp. (stone fruits)* (Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology, Vol. 24. No. 13. P. 1–42. URL: [https://one.oecd.org/document/ENV/JM/MONO\(2002\)13/en/pdf](https://one.oecd.org/document/ENV/JM/MONO(2002)13/en/pdf).
135. Parfitt, D.E., Almehdi, A.A. (1986). *In vitro* propagation of peach: II. A medium for *in vitro* multiplication of 56 peach cultivars. *Fruit Var J*. Vol. 40. No 2. P. 46–47.
136. Peer, F.A., Farooqui, K.D., Dar, K.R., Bhat, M.Y, Hussain, G., Rather, Z.A. (2011). *In vitro* microropogation of sweet cherry (*Prunus Avium* L.) Rootstock Cv. Mazzard. *Applied Biological Research*. Vol. 13. No. 1. P. 10–16.

137. Pérez-Tornero, O., Burgos, L. (2007). Apricot micropropagation. In: Jain, S.M., Häggman, H. (eds) *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits. Springer, Dordrecht*. Chapt. Vol. 25. P. 267–278.
138. Pevalek-Kozlina, B., Jelaska, S. (1987). Microclonal propagation of *Prunus avium* L. *Acta Hortic.* Vol. 212. P. 599–602.
139. Pilar, A., Juan, A. Marín. (2005). *In vitro* culture establishment and multiplication of the *Prunus* rootstock ‘Adesoto 101’ (*P. insititia* L.) as affected by the type of propagation of the donor plant and by the culture medium composition. *Scientia Horticulturae*. Vol. 106. No. 2, P. 258-267. URL: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2005.03.008>.
140. Plant cell and tissue culture. Phytopathology. Biochemicals. Catalogue 2010-2012. Catalogue edited by drs/ F.T.M.Kors. Duchefa Biochemie B.V. 194 p. URL: http://brochure.duchefa-biochemie.com/Duchefa_catalogus_2010_2012/. (дата звернення: 03.02.2022).
141. Pospíšilová, J., Tichá, I., Kadleček, P., Haisel, D., & Plzánková, Š. (1999). Acclimatization of Micropropagated Plants to *ex vitro* Conditions. *Biologia plantarum*. Vol. 42. P. 481–497. URL: <https://bp.ueb.cas.cz/pdfs/bpl/1999/04/01.pdf>
142. Premkumar, A., Mercado, J.A., Quesada, M.A. (2001). Effects of *in vitro* tissue culture conditions and acclimatization on the contents of Rubisco, leaf soluble proteins, photosynthetic pigments, and C/N ratio. *Journal of Plant Physiology*. Vol. 158. No. 7. P. 835–840. URL: <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00214>.
143. Pruski, K. (2007). Tissue culture propagation of Mongolian cherry (*Prunus fruticosa* L.) and Nanking cherry (*Prunus Tomentosa* L.). *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. P. 391–407. URL: https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6352-7_36.
144. Qadiri, I.H., Kamili, A.N., Shah, A.M. (2001). Micropropagation of almond. *Journal of Research and Development*, Vol. 1. P. 111–117.

145. Qadiri, I.H., Kamili, A.N., & Shah, A.M. (2002). Shoot regeneration from mature cotyledons of thin-shelled almond cv. Waris. *Journal of Research and Development*, Vol. 3. P. 9–14.
146. Quoirin, M. and Lepoivre, P. (1977). Improved media for *in vitro* culture of *prunus* sp. *Acta Hort.* Vol. 78. P. 437–442.
147. Redgwell, Bieleski, R.L. (1978). Sorbitol-1-phosphate and sorbitol-6-phosphate in apricot leaves. *Phytochemistry*. Vol. 17. No. 3. P. 407-409.
148. Ritterbusch, C.W., Lucho S.R., Radmann E.B. & Bianchi, V.J. (2020). Effect of Cytokinins, Carbohydrate Source and Auxins on *In Vitro* Propagation of the ‘G × N-9’ Peach Rootstock, *International Journal of Fruit Science*. Vol. 20. No. 3. P. 1607–1619. URL: <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/15538362.2020.1822266?needAccess=true>
149. Rugini, E., Devi, C. Verma (1983). Micropropagation and cell suspensions of a difficult to propagate almond (*Prunus amygdalus* Batsch.) cultivar. *Scientia Horticulturae*, Vol. 28. No. 3. P. 273–281. URL: [https://doi.org/10.1016/S0304-4211\(83\)80019-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4211(83)80019-4)
150. Rugini, E., Cristofori, V. & Silvestri, C. (2016). Genetic improvement of olive (*Olea europaea* L.) by conventional and in vitro biotechnology methods. *Biotechnology advances*. Vol. 34. No. 5. P. 687–696.
151. Polyvianyi A.M., Sytnik I.I., Sliusarchuk V.Ie., Onyshchenko A.S., Moisa Ye.M. (2013). Assessment of the prospects of varieties and enrichment of the hazelnut gene pool in the arboretum of KhNAU. *Bulletin of KhNAU*. no. 1. Forestry. P. 199–202.
152. Şan B., Yildirim A., Yildirim F., Bayar B., Karakurt Y. (2020). Micropropagation of selected almond (*Amygdalus communis* L.) genotypes. *Acta Horticulturae*. Vol. 1285. P. 193–198. DOI: URL: https://www.actahort.org/books/1285/1285_26.htm
153. San, B., Yildirim, A., Yıldırım F. (2014). An *in vitro* germination technique for some stone fruit species: the embryo isolated from cotyledons

successfully germinated without cold pre-treatment of seeds. Vol. 49. No.3. P. 294–296.

154. Santos, A.M., Oliver, M.J., Sánchez, A.M., Payton, P.R., Gomes, J.P., Miguel, C., & Oliveira, M. M. (2009). An integrated strategy to identify key genes in almond adventitious shoot regeneration. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 60. No. 14. P. 4159–4173. URL: <https://www.doi.org/10.1093/jxb/erp250>.

155. Saskin, N., Ak, B.E., Ekinçi, H., Kirca, L., Bak, T., Guler, E., Dogru-Cokran, B., Kılıc D. (2022). The usage of node culture *in vitro* conditions. Proceeding Book 5th. *Intl Agric Cong.* 90–99. URL: <file:///C:/Users/Dell3750/Desktop/Nodeculture.pdf>. (дата звернення: 03.02.2022).

156. Sedgley, M., Collins, G. (2002). Almond improvement in Australia. *Fruits*. Vol. 57. No. 2. P. 129–134.

157. Shabani, Z., Moghadam, E.G., Abedi B., Tehranifar A. (2015). The effect of media and regulators of growth on micro propagation of Myrobalan 29 C rootstock. *J. Hortic Forest*. Vol. 7. No. 3. P. 57–64. URL: <https://academicjournals.org/journal/JHF/article-full-text-pdf/4020E0350785>.

158. Sharma, D.R., Chauhan, P.S., Kaur, R. and Srivastava, D.K. (1992). Micropropagation of colt – A semi-dwarf rootstock of cherry. *Indian Journal of Horticulture*, Vol. 49, no. 3, 209–212.

159. Shibli, R. A., Mohammad, M. J., Ajlouni, M. M., Shatnawi, M. A., & Obeidat, A. F. (1999). Stability of chemical parameters of tissue culture medium (pH, osmolarity, electrical conductivity) as a function of time of growth. *Journal of plant nutrition*. Vol. 22. No 3. P. 501–510.

160. Shibli, R.A., Mohammad, M.J., Ajlouni, Z.I. (2002). Growth and micronutrient acquisition of *in vitro* grown bitter almond and sour orange in response to iron concentration from different iron chelates. *J. Plant Nutr.* Vol. 25. P. 1599–1606.

161. Silvestri C., Cristofori V., Ferramola A., Standardi A. (2016). Adventitious shoot organogenesis from leaf and petiole explants of

European hazelnut. *Scientia Horticulturae*. Vol. 126. P. 59–65. URL: <file:///C:/Users/Dell3750/Desktop/PCTOC.pdf>

162. Singh, A., Bahadur B., Rajam M.V., Sahijram L., Krishnamurthy K.V. (2015). Micropropagation of plants. In : (eds) Plant genomics and biotechnology, 1st edn. *Plant biology and biotechnology*. Vol. 2. P. 329–346.

163. Sotiropoulos T., Fotopoulos S. (2005). *In vitro* propagation of the PR 204/84 peach rootstock (*Prunus persica* × *P. amygdalus*): the effect of BAP, GA₃, and activated charcoal on shoot elongation. *Europ.J. Hort.Sci.* Vol. 70. No. 5. P. 253–255. URL: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/epdf/10.1079/ejhs.2005/34000>.

164. Tabachnik, L., Kester, D.E. (1977). Shoot culture for almond and almond peach hybrid clones in vitro. *HortScience*. Vol. 12. P. 545–547.

165. Thakur, M., Sharma, V., Sharma, D., Kumari G., Vīvek M. (2016). *In vitro* Propagation of Virus Indexed Gisela-5 (*Prunus cerasus* × *Prunus canescens*). Clonal Cherry Rootstock. *IJCST*. Vol. 2. No. 2. P. 87–99.

166. Tsipouridis, C., T. Thomidis. (2003). Methods to improve the *in vitro* culture of GF677 (peach× almond) peach rootstock. P. 361–364. <https://doi.org/10.1080/01140671.2003.9514272>

167. Woodward, A.J. (1995). The optimisation of nitrogen content for micropropagation of eucalyptus marginata. Access mode: URL: https://ro.ecu.edu.au/cgi/viewcontent.cgi?article=1285&context=theses_hons.

168. Xiu-dong, T.A.O., Chun-lan, W. U., Yue-ming, W.A.N.G., Zhi-jun, W.A. N.G., & Yu-lan, W. A. N. G. (2005). Study on rapid propagation of Almond tissue culture. *Xinjiang Agricultural Sciences*. Vol. 6. P 415–417.

169. Zarghami, R., Ahmadi, B. (2023). Production of Plum Pox Virus-Free and Prunus Necrotic Ringspot Virus-Free Regenerants Using Thermotherapy and Meristem-Tip Culture in *Prunus persica* L. *Erwerbs-Obstbau*. Vol. 65. P. 719–727. <https://doi.org/10.1007/s10341-022-00731-5>.

170. Zhang, W., Swarup, R., Bennet, M., Schaller, G.E., & Kieber, J.J. (2013). Cytokinin induces cell division in the quiescent center of the Arabidopsis root apical meristem. *Curr. Biol.* Vol. 23. No. 20. P. 1979–1989.
171. Zimmerman, R.H. (1991). Micropropagation of temperate zone fruit and nut crops. *Technology and Application*. P. 231–246. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-2075-0>.

ДОДАТКИ

АКТ

впровадження в освітній процес матеріалів
дисертаційної роботи Шитої О. П. «Трофічні та гормональні
детермінанти онтогенезу регенерантів *Prunus dulcis* (Mill.) D.A.Webb. *in vitro*».

201 – Агрономія

Комісія у складі декана агробіотехнологічного факультету, кандидата сільськогосподарських наук, доцента В. С. Хахули та завідувача кафедри генетики, селекції і насінництва сільськогосподарських культур доктора сільськогосподарських наук, доцента М. В. Лозінського підтверджують впровадження в освітній процес для здобувачів вищої освіти за спеціальністю «201 – Агрономія» матеріалів наукових досліджень, що увійшли в дисертаційну роботу на здобуття наукового ступеня, доктора філософії О. П. Шитої «Трофічні та гормональні детермінанти онтогенезу регенерантів *Prunus dulcis* (Mill.) D.A.Webb. *in vitro*». Основні результати висвітлені в дисертаційній роботі увійшли до навчальної програми «Біотехнологія рослин», «Біотехнологія та генетична інженерія».

Декан агробіотехнологічного факультету,
кандидат с.-г. наук, доцент



Валерій ХАХУЛА

Завідувач кафедри генетики,
селекції і насінництва сільськогосподарських культур,
доктор с.-г. наук, доцент

Микола ЛОЗІНСЬКИЙ

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

В.о. директора Національного
дендрологічного парку «Софіївка»

НАН України

Володимир ГРАБОВИЙ

«22» листопада 2025 р.



АКТ

ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ НАУКОВИХ РОЗРОБОК

Даним актом підтверджується, що здобувач кафедри лісового господарства Агробіотехнологічного факультету Білоцерківського національного аграрного університету Шита Оксана Петрівна в рамках впровадження результатів дисертаційного дослідження за темою «Трофічні та гормональні детермінанти онтогенезу регенерантів *Prunus dulcis* (Mill.) D.A.Webb. *in vitro*» передала технологію розмноження і вирощування рослин виду *Prunus dulcis* як в умовах *in vitro* у лабораторію мікроклонального розмноження відділу декоративних і плодових рослин Національного дендрологічного парку «Софіївка» НАН України.

Зокрема, передано теоретичне обґрунтування та оновлений підхід до вирішення наукового завдання, що полягало у виявленні фізіолого-біохімічних та анатомо-морфологічних особливостей, які проявляються під час культивування *in vitro*, а також в оптимізації технологічного процесу вирощування рослин виду *Prunus dulcis* як в умовах *in vitro* та адаптації їх до умов *ex vitro*. Ключові аспекти технології включають:

- оптимізацію складу поживних середовищ для стимуляції морфогенезу;
- використання специфічних комбінацій фітогормонів для посилення росту та розвитку регенерантів;
- впровадження методів адаптації регенерантів *in vitro* до умов відкритого ґрунту.

Повний опис технології вирощування рослин виду *Prunus dulcis* як в умовах *in vitro* та адаптації їх до умов *ex vitro* представлений у додатку до даного акту на 5 сторінках машинописного тексту.

Представники Білоцерківського
національного аграрного університету:

Здобувач кафедри лісового господарства

Шита Оксана ПЕТРІВНА

науковий керівник: доктор
сільськогосподарських наук, доцент,
професор кафедри екології та екофізіології

Вячеслав МАЦКЕВИЧ



Представники від НДП «Софіївка» НАН
України:

завідувач лабораторії мікроклонального
розмноження відділу декоративних і
плодових рослин, кандидат біологічних
наук, старший науковий співробітник

Лариса КОЛДАР
завідувач відділу декоративних і плодових
рослин, кандидат біологічних наук

Надія ЦИБРОВСЬКА



СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**Статті в наукових виданнях, включених до переліку****фахових видань України:**

1. Мацкевич В.В., Кімейчук І.В., Мацкевич О.В., **Шита О.П.** Світовий досвід, перспективи в Україні розмноження фундука та мигдалю. *Агробіологія*. 2022. № 1. С. 179–191. DOI: 10.33245/2310-9270-2022-171-1-179-191 (планування і виконання досліджень, аналіз даних, написання статті, частка участі – 25 %).

2. Шита О.П. Детермінанти розмноження *Prunus dulcis* (mill.) D.A.Webb. біотехнологічними методами *Агробіологія*. 2022. № 2. С. 137–152. DOI: 10.33245/2310-9270-2022-174-2-137-152.

3. Шита О.П. Розробка протоколу отримання асептичної культури *Prunus dulcis* (Mill.) D.A.Webb. *Агробіологія*. 2023. № 1. С. 157–168. DOI: 10.33245/2310-9270-2023-179-1-157-168.

4. **Шита О.П.**, Філіпова Л.М., Мацкевич В.В. Особливості мультиплікації *in vitro* кісточкових культур. *Агробіологія*. 2024. № 1. С. 222–236. DOI: 10.33245/2310-9270-2024-187-1-222-236 (планування і виконання досліджень, аналіз даних, написання статті, частка участі – 30 %).

Статті у періодичних наукових виданнях, проіндексованих у базах даних**Web of Science Core Collection та/або Scopus:**

5. Matskevych V., Yukhnovskyi V., Kimeichuk I., Matskevych O., **Shyta O.** Peculiarities of determining the morphogenesis of plants *Corylus avellana* L. and *Prunus dulcis* (Mill.) D.A.Webb *in vitro* culture. *Folia Forestalia Polonica*. 2023. Vol. 65, No. 1. P. 1–14. DOI: 10.2478/ffp-2023-0001 (планування і виконання досліджень, аналіз даних, написання статті, частка участі – 30 %).

Матеріали науково-практичних конференцій:

6. **Шита О.П.**, Філіпова Л.М., Мацкевич В.В. Детермінанти онтогенезу *Prunus dulcis in vitro*. Актуальні проблеми, шляхи та перспективи розвитку ландшафтної архітектури, садово-паркового господарства, урбоекології та

фітомеліорації: матеріали міжнародної науково-практичної конференції (Біла Церква, 16–17 вересня 2021 р.). Біла Церква : БНАУ, 2021. С. 68–70.

7. Філіпова Л.М., Мацкевич В.В., **Шита О.П.** Трофічні детермінанти онтогенезу регенерантів мигдалю *in vitro*. *Генетика і селекція в сучасному агрокомплексі: матеріали VI всеукраїнської науково-практичної конференції*. Редкол.: О.О. Непочатенко (відп. ред.) та ін. (Умань, 15 жовтня 2021). Умань: УНУС, 2021. С. 202–204.

8. **Шита О.П.**, Кімейчук І.В., Мацкевич В.В. Детермінанти росту й розвитку мигдалю *in vitro*. *Сучасний стан та перспективи розвитку науки, освіти та суспільства: збірник тез доповідей міжнародної науково-практичної конференції*. Полтава : ЦФЕНД, 15 серпня 2022. С. 40–42.

9. **Шита О.П.** Вплив фітогормональних та трофічних детермінантів на культивування мигдалю в умовах *in vitro*. *Актуальні проблеми, шляхи та перспективи розвитку ландшафтної архітектури, садово-паркового господарства, урбоекології та фітомеліорації: матеріали II Міжнародної науково-практичної конференції* (Біла Церква, 29 вересня 2022 р.). Біла Церква : БНАУ, 2022. С. 126–129.

10. **Шита О.П.** Детермінація онтогенезу первинних експлантів *Prunus dulcis* (Mill.) D.A.Webb за непрямого морфогенезу. *Аграрна освіта і наука : досягнення та перспективи розвитку: матеріали IV Міжнародної науково-практичної конференції* (Біла Церква, 30 березня 2023 р.). Біла Церква : БНАУ, 2023. С. 46–51.

11. **Шита О.П.**, Мацкевич В.В. Деконтамінація первинних експлантів *Prunus dulcis* (Mill.) D.A.Webb. Сучасний стан, проблеми і перспективи лісівничої освіти, науки та виробництва: матеріали III Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції (Біла Церква, 14 квітня 2023 р.). Біла Церква: БНАУ, 2023. С. 74–77.

12. **Шита О.П.**, Мацкевич В.В., Філіпова Л.М. Вплив живильного середовища на отруєння продуктами окислення фенолподібних речовин. *XVIII*

International Scientific and Practical Conference «Theories of world science and technology implementation». (May 08-10, Osaka, Japan, 2023). С. 10–12.

13. **Шита О.**, Філіпова Л., Мацкевич В. Удосконалений протокол мікроклонального розмноження *Prunus Dulcis* (Mill.) D.A.Webb Collection of Scientific Papers «ΛΟΓΟΣ», (May 26, 2023; Boston, USA). С. 127–130.

14. **Шита О.П.**, Філіпова Л.М., Мацкевич В.В. Особливості загальної стратегії живцювання мигдалю *in vitro*. Матеріали IV Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції (Біла Церква, 19 квітня 2024 р.). Біла Церква: БНАУ, 2024. С. 122-124.

15. **Shyta O.**, Filipova L., Matskevych V. Influence of endogenous determinants on the adaptation of almond plants *in vitro*. *Ресурсозберігаючі технології вирощування культурних рослин : матеріали I Міжнародної науково-практичної конференції*. (Біла Церква, 20 березня 2025 р.). Біла Церква : БНАУ, 2025. С. 39-42.

16. **Shyta O.**, Filipova L., Matskevych V. Influence of light on the determination of rhizogenesis of almond plants *in vitro*. *Аграрна освіта і наука: досягнення та перспективи розвитку : матеріали VI Міжнародної науково-практичної конференції* (Біла Церква, 27 березня 2025 р.). Біла Церква: БНАУ, 2025. С. 100-103.

17. Filipova L., **Shyta O.**, Matskevych V. B.B. Effect of medium acidity on rhizogenesis of sweet almond (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A.Webb) *in vitro*. *Сучасні виклики і актуальні проблеми лісівничої освіти, науки та виробництва: матеріали V Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції* (Біла Церква, 18 квітня 2025 р.). Біла Церква: БНАУ, 2025. С. 95-97.